UNIVERSITÉ DE PARIS — FACULTÉ DE MÉDECINE

Année 1914 **THÈSE** N°

PRÉSENTÉE POUR

LE DOCTORAT EN MÉDECINE

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DES FERMENTS LEUCOCYTAIRES

Les Oxydases et les Protéases Leucocytaires CHEZ L'HOMME

PAR

Mlle V. (L.) ROUDOWSKA

Née à Varsovie (Pologne), le 15 Mars 1888

Président : Monsieur Albert ROBIN, Professeur

IMPRIMERIE DES THÈSES DE MÉDECINE

OLLIER-HENRY

26, Rue Monsieur-le-Prince, 26, PARIS (VI^e^ Ar^t^).

1914

FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

Doyen	M. LANDOUZY
Professeurs	MM.
Anatomie	NICOLAS
Physiologie	Ch. RICHET
Physique médicale	WEISS
Chimie organique et Chimie générale	DESGREZ.
Parasitologie et Histoire naturelle médicale	BLANCHARD
Pathologie et Thérapeutique générales	ACHARD
Pathologie médicale	WIDAL. TEISSIER
Pathologie chirurgicale	LEJARS.
Anatomie pathologique	Pierre MARIE.
Histologie	PRENANT
Opérations et appareils	Auguste BROCA.
Pharmacologie et matière médicale	POUCHET
Thérapeutique	MARFAN
Hygiène	CHANTEMESSE
Médecine légale	THOINOT
Histoire de la médecine et de la chirurgie	LETULLE
Pathologie expérimentale et comparée	ROGER
Clinique médicale	DEBOVE. LANDOUZY. GILBERT. CHAUFFARD.
Maladies des enfants	HUTINEL
Clinique des maladies mentales et des maladies de l'encéphale	Gilbert BALLET
Clinique des maladies cutanées et syphilitiques	GAUCHER
Clinique des maladies du système nerveux	DEJERINE
Clinique chirurgicale	Pierre DELBET. QUENU. RECLUS. HARTMANN.
Clinique ophtalmologique	DE LAPERSONNE
Clinique des maladies des voies urinaires	LEGUEU
Clinique d'accouchements	BAR. PINARD. RIBEMONT-DESSAIGNE.
Clinique gynécologique	POZZI
Clinique chirurgicale infantile	KIRMISSON
Clinique thérapeutique	A. ROBIN

Agrégés en exercice

MM.			
ALGLAVE	GUENIOT	LEREBOULLET	RIBIERRE
BERNARD	GUILLAIN	LERI.	RICHAUD
BRANCA	JEANNIN	LOEPER	ROUSSY
BRUMPT	JOUSSET André	MAILLARD	ROUVIERE
CAMUS	LABBE Henri	MOCQUOT	SAUVAGE
CASTAIGNE	LAIGNEL-LAVASTINE.	MULON	SCHWARTZ
CHAMPY	LANGLOIS	NICLOUX	SICARD
CHEVASSU	LECENE	NOBECOURT	TANON
COUVELAIRE	LEMIERRE	OKINCZYC	TERRIEN
DESMAREST	LENORMANT	OMBREDANNE	TIFFENEAU
GOUGEROT	LEQUEUX	RATHERY	VILLARET
GREGOIRE	LEQUEUX	RETTERER	ZIMMERN

Par délibération en date du 9 décembre 1798, l'École a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui seront présentées, doivent être considérées comme propres à leurs auteurs, et qu'elle n'entend leur donner aucune approbation ni improbation.

A MES CHERS PARENTS

Hommage de ma tendre affection et de ma profonde reconnaissance pour les sacrifices que mes études leur ont imposés et auxquels ils se sont soumis avec une si inépuisable tendresse.

A TOUS LES MIENS

A MES AMIS

A Monsieur le Docteur Noel FIESSINGER

Ancien interne, lauréat des Hôpitaux

Ancien chef de clinique thérapeutique a la Faculté de Paris

A NOTRE MAITRE ET PRÉSIDENT DE THÈSE

Monsieur le Professeur Albert ROBIN

PROFESSEUR DE CLINIQUE THÉRAPEUTIQUE

MEMBRE DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE

MÉDECIN DE L'HÔPITAL BEAUJON

GRAND OFFICIER DE LA LÉGION D'HONNEUR

A LA MÉMOIRE DU Dr Arthur BORDIER

DIRECTEUR DE L'ÉCOLE DE MÉDECINE DE GRENOBLE

A MES MAITRES DE GRENOBLE

A MES MAITRES DANS LES HOPITAUX DE PARIS

M. le Dr Pierre DUVAL

CHIRURGIEN DES HÔPITAUX

M. le Dr Edmond LESNÉ

MÉDECIN DE L'HÔPITAL TENON

M. le Dr RICHARDIÈRE

MÉDECIN DE L'HÔPITAL DES ENFANTS MALADES

AVANT-PROPOS

Avant d'entreprendre notre étude sur les ferments de la série myéloïde, nous tenons à offrir à notre Président de thèse Monsieur le Professeur Albert Robin, l'hommage de notre profonde reconnaissance pour la sollicitude qu'il nous a témoignée en nous accordant le privilège inappréciable de travailler dans son laboratoire. Nous y joignons l'expression de notre admiration constante pour la clarté et la haute valeur de son enseignement, ainsi que nos plus sincères remerciements pour le grand honneur qu'il nous fait en présidant notre thèse.

A Monsieur Noel Fiessinger nous réservons la meilleure part de nos sentiments de gratitude. D'abord pour les services inoubliables qu'il nous a rendus au début de nos études et pour l'estime qu'il nous a témoignée ensuite en nous autorisant à collaborer avec lui dans ses travaux d'expérimentation. C'est de lui également que nous tenons nos connaissances d'histologie et d'anatomie pathologique.

Il est donc pour nous non seulement un chef mais

un ami et c'est à ce double titre que nous le prions d'accepter la dédicace de notre travail.

C'est avec M. Noël Fiessinger que nous avons entrepris en 1912 l'étude des oxydases ; depuis nous avons poursuivi nos recherches et l'intérêt qu'elles présentent nous ont inspiré de droit le sujet de notre thèse.

INTRODUCTION

L'organisme humain, à toutes les périodes de sa vie, subit de la part de divers agresseurs des attaques continuelles. Il succomberait infailliblement à toutes ces atteintes s'il n'était doué d'une résistance considérable et d'un pouvoir de réaction à l'égard des éléments nocifs. Nous nous occuperons ici particulièrement de la lutte anti-infectieuse et antitoxique dans laquelle interviennent les réactions leucocytaires.

La défense antimicrobienne est le résultat de l'action de différents processus : de la *phagocytose*, des *anticorps*, des *ferments leucocytaires* et des *ferments sériques*.

Phagocytose. — La phagocytose décrite par Metchnikoff est le premier et le plus simple acte de défense. Il consiste en une lutte entre l'élément nocif et le phagocyte. C'est presque un corps à corps entre deux adversaires. Metchnikoff donne le nom de phagocytes à des cellules douées de mouvements amiboïdes. La phagocytose est effectuée par deux variétés de cellules :

les leucocytes et les macrophages qui sont des cellules dérivées du tissu conjonctif.

Aussitôt que les microbes s'introduisent dans l'organisme ils exercent une action chimio-taxique positive sur les leucocytes. Les polynucléaires pénètrent dans le foyer d'infection par diapédèse et s'y amassent en quantité considérable. En même temps l'organisme réagit par la lymphocytose. Mis en contact avec les microbes les polynucléaires les englobent, les rendent inoffensifs et finalement les digèrent. Cette digestion intra-cellulaire s'opère de la même manière que tout acte de digestion normale. Les propriétés digestives des polynucléaires sont devenues évidentes depuis l'application moderne de diverses recherches biologiques. Helmeister prouve la présence de la peptone dans le pus et par cette constatation il apporte une preuve incontestable de la présence des ferments digestifs dans le protoplasma des polynucléaires.

Pour Metchnikoff la phagocytose sert de base à la théorie du phénomène d'immunité. Pour lui le rôle principal de la défense est basé sur l'existence de ferment digestif, d'un ferment capable de digérer les micro-organismes. Pour cet auteur il y aurait deux sortes de ferment qu'il appelle cytases : une *microcytase* produite par les polynucléaires et une *macrocytase* produite par les macrophages.

La phagocytose ne suffit pas toujours à expliquer le processus de défense. Il existe des cas où la destination directe du bacille par la leucocytose ne peut-être incri-

minée et à cette théorie vient s'en opposer une autre envisageant le pouvoir bactéricide des humeurs : c'est la théorie des anticorps.

Action des anticorps. — Ce mode de défense n'est pas spécifique à l'immunité antibactérienne. Il se produit également à la suite de la pénétration dans l'organisme d'autres produits étrangers. La réaction dont nous nous occupons en ce moment se produit par l'élaboration des anticorps.

Buchner constata le premier que la virulence des microbes est diminuée par leur séjour dans le sérum. Cette particularité du sérum disparaît par le chauffage à 55°. L'auteur explique la propriété destructive du sérum par la présence d'une substance qu'il appelle l'alexine et dont la principale propriété est d'être thermolabile.

Plus tard Bordet et Gengou établissent que le sérum contient une autre substance qu'on peut séparer de l'alexine par le chauffage. Ils l'appellent sensibilisatrice. Cette autre substance est spécifique c'est-à-dire destinée à lutter uniquement contre une variété donnée de microorganismes. On la sépare de l'alexine par le chauffage car elle résiste à la température de 55°. Son action principale est de préparer le bacille à l'action de l'alexine, elle agit donc en le sensibilisant. Il est classique de comparer l'action de la sensibilisation sur l'élément agresseur à l'effet produit par un mordant qui prépare le terrain à l'action plus facile et plus complète d'une

teinture. C'est le mordançage qui trouve en technique histologique une si large application.

Bordet envisage le mécanisme de l'action bactéricide du sérum de la manière suivante : La sensibilisatrice, substance spécifique, se fixe sur le corps microbien, qu'elle ne peut ni attaquer ni détruire à elle seule, mais elle se fixe solidement en imprégnant le bacille. Ensuite l'alexine vient se fixer à son tour sur la sensibilisatrice et elle détruit le corps sensibilisé. Ainsi l'antigène, au moment de la pénétration, constitue la substance générative des anticorps élaborés par l'organisme et destinée à combattre les substances étrangères. Les anticorps n'ont pas pu être isolés. Leur production est immédiate mais peut se manifester tardivement seulement comme par exemple l'agglutination dans la fièvre typhoïde. Les anticorps sont très nombreux ils constituent les agglutinines, les lysines, les opsonines, les précipitines et les anti-toxines. La nature de ces corps n'est pas déterminée, il est possible qu'il s'agisse des coloïdes inconnus pour le moment.

Erlich imagina une théorie très ingénieuse qui vise la formation des anticorps. Le savant allemand a été frappé par le fait que certains produits toxiques ont des affinités toutes particulières pour certaines cellules seulement comme par exemple la toxine tétanique. L'assimilation des subtances toxiques se produit dans des parties déterminées du protoplasma cellulaire et se trouve subordonnée à la structure moléculaire de ce protoplasma. La molécule protoplasmique peut être comparée à un

noyau chimique central muni de chaînes latérales. Grâce à la présence de ses récepteurs la cellule peut fixer et assimiler les matières nutritives de même que les matières nuisibles. Les antigènes également sont composés de plusieurs parties. Erlich suppose que la cellule pathogène est formée d'un groupement toxophore qui contient la toxine, et d'un autre groupement haptophore spécifique qui seul est capable de se fixer sur le récepteur. La fixation de la toxine sur le protoplasma peut aller souvent jusqu'à la mort de cette cellule trop imprégnée de poison, mais si la mort n'est pas trop rapide la réaction de défense peut s'effectuer et la cellule produit alors un grand nombre de nouveaux récepteurs. Les récepteurs néoformés se détachent de la cellule maternelle ; ils se déversent dans le sang et constituent l'antitoxine capable de préserver les autres cellules.

Telles sont les théories émises par les auteurs différents, nous avons essayé de les résumer rapidement sans entrer dans les détails. Mais pour se défendre l'organisme ne se borne pas à ces deux genres de lutte, il possède d'autres moyens de défense. Nous laissons de côté le rôle qu'occupent au cours des processus normaux et pathologiques les organes tels que le foie, la rate et le rein en utilisant et en éliminant les toxines, nous nous occuperons uniquement des ferments leucocytaires.

Ferments leucocytaires. — L'étude de la phagocytose a permis de supposer l'existence de ces ferments. Aujourd'hui nous n'avons plus aucun doute sur leur

existence réelle démontrée à plusieurs reprises par une expérimentation sérieuse. Les ferments de défense les plus importants sont les oxydases, les ferments protéolytiques et les ferments lipolytiques.

Dans la physiologie cellulaire les oxydases jouent un rôle incontestable car tous les processus vitaux dépendent de l'oxydation. S'il survient une atteinte grave immédiatement l'oxydation est profondément troublée. Les échanges nutritifs se modifient et tout l'organisme subit l'influence des processus pathogènes autant au cours de différentes infections que dans les intoxications.

L'oxydase joue donc le rôle d'un véritable ferment de défense. A ce sujet l'application thérapeutique des ferments artificiels préconisée par notre maître M. le Professeur Albert Robin, apporte un document de plus à l'appui de ces faits.

La protéase et la lipase ont des propriétés digestives. Ainsi Leber remarque que le pus d'hypopion digère la fibrine et liquifie la gélatine. Ce ferment est analogue aux ferments tryptiques. Le rôle de ce ferment est important. Il intervient, comme l'a démontré Metchnikoff dans la lutte anti-microbienne en digérant l'élément pathogène. Son action est manifeste et particulièrement évidente dans la résorption des exsudats fibrineux. MM. Noel Fiessinger et Paul Baufle démontrent dans leurs communications sur le rôle des ferments leucocytaires dans la résolution des exsudats pneumoniques que l'exsudat alvéolaire n'est pas résorbé mais « digéré

sur place par le ferment protéolytique des leucocytes ».

La lipase, ferment secrété par les éléments de la série lymphoïde, est destinée à la lutte avec des microorganismes qui ne peuvent être attaqués par le ferment protéolytique comme, par exemple, le bacille de Koch. Ce bacille est enfermé dans une coque graisseuse qui le protège contre l'action du ferment. La lipase agit en dissolvant l'enveloppe graisseuse du bacille, elle le sensibilise pour ainsi dire et prépare sa destruction définitive.

Ferments du sérum. — Les oxydases, les protéases et les lipases sont des ferments de défense propres aux leucocytes, mais il existe d'autres ferments qui restent à l'état de dissolution dans le sérum et qui exercent leur action par un mécanisme tout différent. Nous envisageons en ce moment le ferment d'Abderhalden, professeur de physiologie à l'Université de Halle. Ces ferments sont destinés à défendre l'organisme contre les albumines étrangères absorbées par voie parentérale (sous-cutanée, intra-veineuse, intra-séreuse) par un processus de digestion trytiques. Leur pouvoir s'exerce sur les albumines qui se trouvent dénaturalisées par dissociation de la grosse molécule albuminoïde en acides aminés. Ces ferments sont aussi variés que les albumines absorbées, ils sont spécifiques pour ces albumines, c'est-à-dire qu'après injection de l'albumine de rein le ferment de défense produit ne digère que ces albumines, à l'exclusion de toute autre. Au cours de

certaines dégénérescences viscérales des ferments peuvent apparaître spécifiques pour l'albumine dégénérée comme si on avait pratiqué l'injection parentérale.

Avant d'aborder toutes ces questions nous pouvons nous demander: qu'est-ce donc que le ferment en général ? quelle est sa fonction ? comment agit-il ?

Ferments en général et leur action. — Pour Pasteur, le ferment est un être vivant, capable de produire des actes caractérisés par la disproportion entre le poids de l'agent et l'effet produit. C'est le vrai ferment ou ferment figuré. Aujourd'hui, en physiologie, on se sert du terme de « ferment soluble » ou « diastase » pour désigner une substance chimique douée des propriétés semblables au ferment figuré.

Si on broie la cellule, l'élément anatomique est détruit, mais la cellule ne perd pas encore toute son activité. Elle peut encore effectuer des modifications sur d'autres organismes. C'est donc par son élément chimique seul qu'elle agit puisqu'elle n'existe plus comme unité anatomique. Les diastases contenues dans la cellule représentent son élément actif, leur rôle prend une telle importance dans la vie cellulaire qu'il doit être considéré aujourd'hui comme l'instrument véritable de tout travail chimique de l'organisme. Selon l'expression pittoresque de Duclaux les diastases « ont détrôné la cellule », ils deviennent des agents essentiels du fonctionnement de nos tissus. Leur action se caractérise par la disproportion entre l'effet et la cause, ainsi une

diastase à un poids infiniment petit peut produire des transformations infiniment grandes.

Le deuxième caractère de la diastase est le fait qu'elle ne se détruit pas en agissant, et se retrouve, quand elle a fini son œuvre, prête à recommencer une nouvelle ». (E. Duclaux) L'action des diastases peut être ralentie et même supprimée entièrement soit par la température défavorable ou par l'agent chimique ocif. Les diastases sont généralement solubles dans l'eau et donnent des solutions colloïdales. Leur nature chimique n'est pas connue.

Les diastases sont des agents catalytiques ou catalyseurs, c'est-à-dire qu'ils agissent en faible masse et ne subissent aucune modification. Oswald définit le phénomène de catalyse de la façon suivante : « Phénomène « par lequel, grâce à la présence d'un corps, la vitesse « d'une réaction et la vitesse seule est modifiée sans que « le corps subisse lui-même des modifications. Pour « E. Kohn, la catalyse n'est qu'une suite de transforma- « tions chimiques intermédiaires s'accomplissant autour « d'un noyau qui est le catalyseur. » Enfin Bredig caractérise l'influence des catalyseurs par une comparaison aussi juste qu'imagée. Il les compare à des corps gras qui lubrifient les différentes parties d'une machine ou d'un moteur en action. Pour étudier la catalyse, Bredig se sert des métaux colloïdaux. A l'aide de ces préparations, il réussit à réactiver toutes les opérations diastasiques. Les diastases, à leur tour, se comportent comme des catalyseurs, car elles produisent avec la plus grande

facilité les actes chimiques complexes, tels que l'oxydation, la réduction et l'hydratation. Elles sont catalyseurs pour deux raisons : 1° par leur composition chimique car elles contiennent un métal ; 2° par leur état physique, car elles sont des colloïdes. Pour Bertrand, les diastases sont des matières albuminoïdes qui servent de support à un métal.

Doué de telles propriétés, le ferment devient, dans la vie de la cellule, un facteur essentiel. C'est grâce à lui que la cellule se nourrit, se modifie et se défend. C'est surtout cette dernière qualité qui donne aux ferments leucocytaires une si grande importance dans la pathologie ; elle intervient dans la lutte anti-infectieuse et antitoxique ; elle manifeste sa puissance en réalisant divers actes d'oxydation ; enfin elle est liée à la vie de la cellule et prolonge même son action après la mort.

Dans ce travail nous ne nous occuperons pas de toutes ces questions intéressantes ; nous nous bornerons à l'étude des oxydases et des protéases propres à la série myéloïde et au rôle de défense qu'elles jouent dans l'organisme. Duclaux résume en quelques lignes toute l'étendue de l'action des ferments et nous nous permettons de rapporter en entier son opinion :

« Qu'il survienne maintenant un événement imprévu, « un ennemi venant de l'extérieur, la cellule n'est pas « désemparée, et ce sont encore les forces physiologi- « ques et antérieures au danger qui agissent. Chez les « animaux inférieurs, la cellule a une plasticité qui « lui permet d'organiser la résistance avec ceux de ses

« éléments qui sont les plus aptes à servir de moyens « de défense. C'est une maison bloquée qui se défend. « Chez les animaux supérieurs où le perfectionnement « a rendu la cellule plus délicate, il y a un corps de « police chargé de pourvoir à tous les besoins im- « prévus, et, ici encore, qui, exaltées par l'usage, par « l'appropriation de plus en plus parfaite à une beso- « gne, entrent en lutte avec l'ennemi venu de l'extérieur.

« C'est là la conception profonde de Metchnikoff, « chez les leucocytes, chez les phagocytes, nous avons « trouvé les diastases en abondance et le travail de Bor- « det nous a montré que même celles qui semblaient le « plus spécialisées, les diastases les plus spécifiques « existaient à l'état de serviteurs endormis jusqu'au « moment où il fallait agir. Cette prévoyance univer- « selle qui a mis d'avance dans la cellule les moyens de « conserver tous les biens et le remède éventuel à tous « les maux, est évidemment, dans son essence, une œu- « vre moins compliquée que nous nous le figurons. « Nous ne voyons en ce moment que l'infini détail, et « c'est lui qui nous étonne. Lorsque nous connaîtrons « les lois qui le commandent, nous nous étonnerons « moins, mais nous admirerons davantage ».

CHAPITRE I

Etudes des oxydases directes et indirectes

I. Etude générale

Toute cellule active et vivante puise sa force vitale dans l'absorption des substances nutritives indispensables à son existence. La nutrition est assurée par la combustion ou l'oxydation des éléments indispensables, mais, pour se produire, elle exige des conditions particulières favorisant le processus.

L'oxygène de l'atmosphère ambiante ne peut pas se fixer directement sur la cellule. Il doit posséder une activité plus grande qu'à l'état habituel. Il l'acquiert à l'état naissant.

Les chimistes ont remarqué que pour la combustion des albuminoïdes, des graisses ou des hydrocarbones il faut, soit des oxydants très puissants, soit une température très élevée. Ils remarquent en même temps que dans l'organisme vivant, ce processus se produit très facilement et à une température relativement peu élevée. Schoenbein donna une explication scientifique au phénomène observé. Il constata l'existence de nombreux corps

capables de décomposer l'eau oxygénée et de donner à l'oxygène dégagé un pouvoir oxydant plus énergique qu'à l'état normal. Ce gaz posséderait alors des propriétés caractéristiques pour l'ozone, actif même à l'égard des substances et des corps qui ne sont pas attaqués dans des conditions habituelles. Pour Schoenbein l'oxygène semblerait s'associer avec une substance préexistante, il formerait une « ozonide » qui, à son tour, servirait d'intermédiaire à l'oxygène en lui permettant de se transporter sur toute une série de corps oxydables.

Traube alla plus loin dans le domaine des hypothèses. Il imagina l'existence du corps qu'il appelle dans un langage imagé les « *sauerstoffübertrager* » dont le rôle principal consisterait à servir de véhicule à l'oxygène qui vient de fixer sur les substances appelées « *sauerstoffnehmer* » mais cet échange se produirait seulement grâce à l'intervention de corps existants « *sauerstoffereger* » dont l'action serait analogue à celle des ferments.

Malheureusement cet auteur n'apporte aucune preuve expérimentale à l'appui de son hypothèse uniquement théorique. Le mérite d'une étude expérimentale revient à toute une liste de savants qui ont publié sur ce sujet intéressant une série de travaux approfondis. Nous citerons, à cette occasion des noms tels que Bourquelot, G. Bertrand, Portier, Abelous et Biarnès, Jaquet, Salkowski, Schmideberger, Erlich.

Les ferments oxydants furent étudiés très minutieusement dans le monde végétal par le professeur G. Ber-

TRAND. Il nous est impossible d'entrer dans les détails intéressants de ses constatations, car ceci nous conduirait trop loin, mais nous croyons utile de rappeler l'importance capitale attachée par ce savant à la présence de sels minéraux dans la composition chimique des ferments qu'il désignait du nom général d'oxydase.

EMILE BOURQUELOT consacra à l'étude des oxydases toute une série de travaux très documentés. Il emploie pour la première fois le terme de « *ferments oxydants* » et les classe en quatre groupes : 1° l'ozone, 2° les ozonides, 3° le ferment oxydant direct et 4° le ferment oxydant indirect, capable de produire l'acte d'oxydation à condition de se trouver en présence d'une substance intermédiaire riche en oxygène comme par exemple l'eau oxygénée. Cette dernière catégorie d'oxydase a été étudiée sous des noms différents.

Ainsi RACIBORSKI l'appelle *leptomine*. LINOSSIER la désigne par le nom *peroxydase*. BOURQUELOT critique ce dernier terme. En effet le nom de peroxydase devrait être conservé pour désigner une substance capable de décomposer les peroxydes. Pour remplacer ce terme défectueux l'éminent chimiste propose d'appeler les oxydases indirectes *anaéroxydases*.

II. — Propriétés chimiques des oxydases.

D'une manière générale, toutes les oxydases possèdent les mêmes propriétés qui les rapprochent des diastases :

1° Leur principale qualité est de pouvoir déterminer sous un poids infiniment petit des transformations infiniment grandes.

2° Les antiseptiques en général, à l'exclusion de l'alcool, entravent l'action des ferments.

3° Leur activité présente un maximum à la température optima de 45° ; elle diminue par le chauffage prolongé à 60° pour disparaître complètement entre 80° et 100°.

4° Les ferments sont solubles dans l'eau pure.

5° Par contre, l'alcool fort et les solutions salines neutres à faible concentration (azotate de potasse, sulfate de soude, chlorure et iodure de sodium) forment un précipité.

6° Les ferments ne dialysent pas.

Abelous et Biarnès ont réussi à isoler le ferment oxydant en soumettant les organes à la digestion artificielle par la papaïne et la pancréatine. L'agent oxydant est retrouvé dans le résidu réfractaire au pouvoir des ferments digestifs. Ces deux auteurs ont obtenu les oxydases à l'état de précipité par l'action de l'alcool fort et en laissant passer à travers une solution aqueuse du ferment un courant prolongé de CO^2. Le précipité présente tous les caractères des globulines.

Nous n'insistons pas sur les autres caractères du ferment et renvoyons pour tous renseignements plus précis à des travaux consacrés uniquement au côté clinique de la question. Cette étude a été poursuivie par les auteurs tels que Bertrand, Bourquelot, Abelous et Biarnès, Portier et Abelous et Aloy.

Quelle est la composition chimique du ferment ? Ici nous nous trouvons en face de deux théories :

1° La première a pour défenseur le professeur G. Bertrand, qui attribue toute activité de ferment à la présence d'un métal dans sa composition.

En étudiant la laccase le savant chimiste y trouva des sels de manganèse en quantité appréciable. Il remarqua ensuite que le pouvoir oxydant du ferment était augmenté par la présence de ce métal qui, par lui-même, est peu oxidant. Dans un travail suivant, l'auteur constate que les sels de manganèse jouissent du pouvoir de transporter l'oxygène sur certains composés organiques facilement oxydables comme l'hydroquinone, le pyrogallol, la résine de gaïac. Ainsi expérimentalement les sels de ce métal peuvent servir d'oxydase artificielle.

Plus tard on découvrit des ferments oxydants contenant du cuivre. Sartou trouve dans son schinoxydase retirée de schinus molle des sels de fer.

Les constatations précédentes conduisent Bertrand à la conclusion suivante : l'activité du ferment oxydant est en raison directe de sa teneur métallique.

2° a) Cette théorie de G. Bertrand fut opposée une conception toute différente dans laquelle le métal n'occupe qu'une place secondaire. Il constituerait pour les défenseurs de la nouvelle hypothèse le squelette minéral. Chimiquement les oxydases représentent une matière albuminoïde, se rapprochant des nucléo-albumines, et c'est cette dernière substance qui est le véritable élément actif fixé sur une charpente métallique. Les prin-

cipaux apôtres de cette hypothèse furent Slowtzoff et Spitzer.

A côté de ces deux opinions principales nous signaons également l'avis de Bréaudat qui considère l'oxydase comme un diéther carbonnique d'indoxyl.

L'accord au sujet de la composition de ces ferments intéressants est loin d'être établi. Pierre Sée, dans sa thèse, cherche à conbiner les deux théories qui, au fond, ne le contredisent pas, et il estime que les oxydases sont des albuminoïdes dérivés des nucléoproteïdes associés à un métal. La question est encore difficile à trancher et reste sujette à des variations. Il est d'une difficulté bien moins grande de montrer par des réactions chimiques l'existence du ferment. Les réactifs sont nombreux et nous nous bornerons à leur simple énumération, sans entrer dans les détails de la réaction tout en nous réservant le droit de revenir sur ce sujet au moment où nous parlerons de la technique.

Les auteurs se sont servis couramment de la teinture de gaïac, du gaïacol, du pyrogallol, de l'hydroquinone, d'alcool benzylique et d'aldehyde salycilique.

Plus tard Röhmann et Spitzer introduisent un réactif nouveau, constitué d'un mélange de l'alpha-naphtol et du paraphynylendiamine en présence du bicarbonate de soude avec ce dernier réactif les résultats sont très démonstratifs et se prêtent facilement à l'appréciation des expérimentateurs. Il se montre également de la plus grande utilité pour l'étude microchimique.

Mais avec tous ces réactifs différents le principe res-

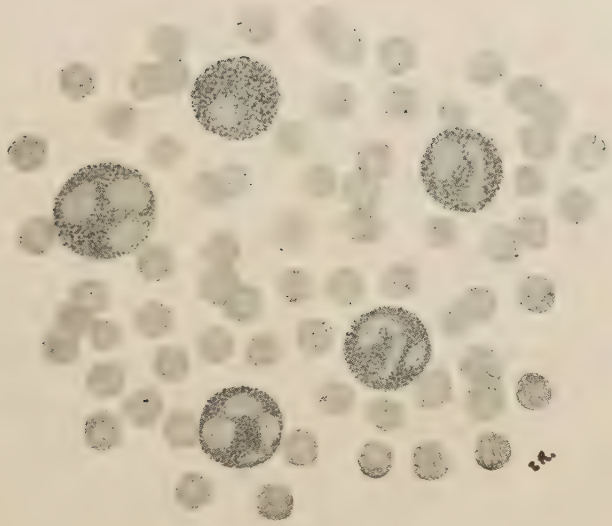

Fig. I

Réaction oxydante directe des polynucléaires

Sang normal de l'homme (Dessin à la chambre claire)

Technique { Naphtol α 1/4000
Paraphénylène-diamine 1/000 $^{a\hat{a}}$

le le même. Les substances chimiques facilement oxydables étaient mises en présence de ferments capables de fixer l'oxygène, soit puisé dans l'atmosphère soit en en décomposant l'eau oxygénée. L'oxygène, rendu actif par l'action du ferment, oxyde le réactif employé en déterminant une coloration caractéristique et facile à observer. Ainsi avec la teinture de gaïac on obtient une coloration d'un bleu-vert, avec l'hydroquinone une teinte rouge-brun et avec le mélange de α-naphtol et de diméthylparaphenylendiamine une belle coloration violette.

Grâce à la simplicité remarquable de tous ces procédés et le grand intérêt que présente cette étude, un grand nombre de savants se sont occupés de la question. Ils les étudièrent dans les règnes végétal et animal même chez l'homme. Différents ferments furent découverts, nous n'en citerons que quelques-uns : par exemple la tyrosinase des champignons, la laccase à laquelle Bertrand consacre de nombreux travaux d'une importance capitale, l'œnoxydase, la maloxydase, l'oléase, la spermase, et le schinoxydase de Sartou, etc., etc.

Plusieurs espèces bactériennes contiennent des oxydases. Emile Bourquelot constata au Congrès de Moscou en 1897 que de nombreuses substances médicamenteuses contiennent des ferments oxydants et il attire l'attention sur leur présence au point de vue de la pratique thérapeutique. Dans les tissus, des animaux les oxydases sont aussi répandues que dans le règne végétal ; on les trouve chez les insectes, chez les crustacés, chez les mammifères et finalement chez l'homme.

Quel est le siège exact de ces ferments ? Les auteurs ne sont pas tous d'accord à ce sujet, et la divergence d'opinions a provoqué de nombreuses discussions. Les savants les plus autorisés sont en désaccord absolu. Abelous et Biarnès prétendent que le siège principal des oxydases se trouve dans le tissu des organes et que le sang par lui-même est pauvre en ferment. Parmi les appareils glandulaires riches en oxydases, le foie et la rate occupent la première place. Par contre la substance cérébrale et le muscle sont extrêmement pauvres en ferment et n'en contiennent presque pas. Enriquez et Sicard trouventdes ferments oxydants dans le corps thyroïde.

Carnot constate leur présence dans la salive, la sécrétion nasale et lacrymale et dans le pus. Dastre et Floresco le trouvent dans la bile. Cavazani dans le liquide céphalo-rachidien. Enfin Portier soutient le premier l'origine leucocytaire des oxydases. Pour cet auteur l'oxydase n'existe ni dans le sang d'un animal vivant, ni dans ses tissus, elle est localisée uniquement dans les globules blancs et au moment de la mort du leucocyte le ferment est mis en liberté. Les recherches ultérieures ont démontré que cette opinion fut trop exclusive ; néanmoins, c'est aux travaux de cet auteur qu'est due la découverte de nouveaux horizons dans cette étude intéressante. La nouvelle époque fut marquée par l'introduction du microscope dans la science des oxydases, là où l'appréciation chimique était seule en vue.

III. Etudes microchimiques

La méthode d'investigation histo-chimique n'apporte aucune modification nouvelle dans la classification des oxydases. Les ferments oxydants sont toujours subdivisés en deux grands groupes : 1° les ferments directs et 2° les ferments indirects.

1° LES FERMENTS OXYDANTS DIRECTS

a) **Etude générale.** — Le mérite d'introduction de la nouvelle méthode micro-chimique dans la pratique des laboratoires revient au savant allemand WALTER H. SCHULTZE. Il s'est servi d'une technique élégante basée sur l'emploi du réactif de RÖHMANN et SPITZER. Pour le moment nous n'entrons pas dans les détails de sa méthode que nous aurons l'occasion de reprendre ensuite, et nous nous occuperons uniquement du principe qui fait la base de la réaction. La solution colorante est composée, comme nous l'avons mentionné plus haut, d'un mélange de l'^{2} naphtol et de paraphénylene-diamine. Le réactif est d'une sensibilité remarquable donnant une action fidèle en présence de toute substance oxydante et en particulier avec les ferments oxydants des leucocytes. Le professeur Erlich explique l'action du réactif par la formation du bleu indigo au niveau des granulations leucocytaires qui contiendront un « leuco product » d'origine cellulaire capable d'opérer cette transformation que le savant allemand résume dans la formule suivante :

$$C_6\,H_4\begin{vmatrix}Az\,H^2\\ Hz\,(\,Ch^3\,)_2\end{vmatrix} + C_{10}\,H_7\,[\alpha]\,OH + O^2 = C_6\,H_4\begin{vmatrix}Az\,(Ch^3\,)^2\\ 4\ az\end{vmatrix}$$
$$= C_{10}\,H_5\,[\alpha]\,OH + H^2\,O$$

La preuve qu'il s'agit réellement d'une oxydase se retrouve dans toute une série de caractères propres uniquement à la nature des ferments. La réaction diminue et disparait complètement par l'action de la chaleur; elle est supprimée par toutes les substances détruisant le pouvoir oxydant des diastases. Enfin elle est confirmée par l'analogie des résultats d'examen microscopique à l'aide du réactif même et d'autres réactifs de contrôle.

Nous avons ajouté dans nos recherches précédentes, quelques caractères nouveaux, que nous résumons rapidement :

1° *Le chauffage prolongé* pendant 48 heures des préparations séchées à la température de 3° ne diminue pas le pouvoir oxydant des ferments, par contre le chauffage à 80° supprime entièrement toute trace de coloration dans l'espace de quelques minutes.

2° *La lumière et le temps* ne produisent aucun effet nocif à la netteté de la coloration. Les vieux frottis de sang et de pus qui ont été exposés à l'air sur la table du laboratoire pendant plusieurs mois ont été colorés de la même manière que les frottis récemment étalés.

3° *L'autolyse* en milieu aseptique et humide, prolongée pendant 48 heures, supprime entièrement toute coloration bleue. Les mêmes conditions d'autolyse peuvent se produire dans l'organisme d'une manière spontanée par cytolyse cellulaire. Ainsi, le pus très cytolisé ne donne point de coloration avec le réactif de Röhmann et Spitzer.

4° Certaines substances chimiques telles que le sublimé et la potasse détruisent les oxydases. L'alcool, l'éther et le formol à 10 o/o diminuent très fortement les propriétés du ferment. Cette constatation donne une explication suffisante pour justifier certaines expériences appliquées à la recherche des oxydases dans les coupes de tissus dont les diverses manipulations suppriment manifestement les propriétés intéressantes de la réaction. Gierke, qui s'est occupé d'une façon presque exclusive de la recherche des ferments oxydants dans des parenchymes d'organes, n'emploie aucun fixateur et étudie les coupes fraîches.

5° La *sensibilité de la solution de l'α naphtol-paraphénylène-diamine* a fait l'objet de nombreuses critiques soulevées par les chimistes. On reproche au réactif son altérabilité facile par l'action de l'air et de la lumière. Mais l'idée d'une précipitation d'ordre purement physique doit être écartée, grâce à la persistance de la coloration au niveau des granulations, même avec l'emploi de solutions extrêmement diluées, jusqu'à 1 pour 8.000. Même avec ces dilutions considérables, l'apparition de la coloration est presque instantanée et indiscutable. Au bout de deux minutes de contact du réactif avec les leucocytes, les granulations apparaissent teintées en bleu-violet. Certes, l'intensité de la réaction est en rapport direct avec la concentration des solutions, mais elle ne prête pas à la discussion lorsque le titrage des solutions est très faible. Nous avons pu établir le tableau suivant qui illustre les résultats obtenus :

TITRAGE DES SOLUTIONS

Paraphénylene-diamine	α. Naphtol	Réaction
—	—	—
1/1000	1/4000	+ + +
1/2000	1/8000	+ +
1/4000	1/4000	+
1/8000	1/8000	+

b) **Technique**. — Plusieurs techniques furent proposées pour l'étude des oxydases. Walther H. Schultze recommande trois procédés différents ; chacun des auteurs, qui se sont occupés de la question, apporte une nouvelle modification donne un conseil pratique et intéressant, qui n'enlève rien au principe même.

Nous rapportons les trois techniques décrites par Schultze. 1° Préparer séparément les solutions d'alpha-naphtol et de dimethylparaphenylendiamine. Faire dissoudre à chaud 1 gr. d'alpha-naphtol dans 100 gr. d'eau distillée, verser goutte à goutte après le refroidissement complet la solution de potasse jusqu'à la dissolution parfaite de l'alpha-naphtol, difficilement soluble dans l'eau. Généralement 1 cc. suffit.

Ensuite préparer une solution de dimethylparaphénylendiamine à 1 pour 100.

Les deux solutions sont mélangées à parties égales au moment de s'en servir. Filtrer. Déposer quelques gouttes de ce mélange sur la préparation, laisser en

contact pendant cinq minutes et examiner à l'immersion. Les granulations sont colorées en violet foncé.

2° Dans sa deuxième technique l'auteur se sert d'un mélange de « mikrocidin » de Merck (composé sodique de $_2$ naphtol à 2 o/o et d'une solution aqueuse à 1 o/o de chlorhydrate de dimethylparaphémylène-diamine). A l'aide de ce procédé les granulations contenant du ferment se colorent en vert, les globules graisseuses ne prennent aucune coloration et, pour les mettre en évidence, l'auteur se sert du Soudan III colorant spécifique des graisses.

3° Enfin le dernier procédé consiste à employer, à parties égales, le mélange d'une solution alcaline à 1 o/o de naphtol et d'une solution aqueuse de paranitrosodiméthylanilin à 1 o/o. Le liquide obtenu est jaune. Filtrer et colorer. Les granulations leucocytaires apparaissent en brun-noir.

Pour faciliter la dissolution de l' $_2$ naphtol, Winkler donne sa préférence à la soude. Comme fixateur il se sert d'alcool. Traiter les préparations en se servant de chacune séparément, laisser en contact avec le frottis pendant quelques minutes. Pour rendre la coloration plus nette encore, il recommande la double coloration à la vésuvine et l'imprégnation à la vapeur d'iode.

Enfin Gierke, pour adapter la technique à la coloration des coupes, apporte encore une nouvelle modification au procédé de Schultze. Il se sert de solutions de réactifs dans le sérum chloruré sodique et il supprime

entièrement le passage par les fixateurs généralement nuisibles pour les ferments oxydants.

Personnellement nous nous sommes servi des solutions aqueuses faibles : alpha-naphtol à 1 pour 1000 et le paraphénylène-diamine à 1 pour 4000. Nos solutions sont préparées séparément, conservées à l'abri de l'air et de la lumière ; les liquides sont mélangés au moment de l'utilisation et employés sans aucune filtration, car aucune précipitation appréciable à l'œil ne s'est produite. Les coupes et les frottis sont plongés dans la solution ainsi préparée, de 2 à 5 minutes. Laver les préparations à l'eau, couvrir d'une lamelle et examiner aussitôt.

Jamais nous ne nous sommes servi des solutions alcalines, contrairement aux auteurs allemands, car nous considérons que la soude et la potasse entravent la réaction. De plus l'α naphtol se trouve toujours à l'état de concentration suffisante pour produire la coloration. Pour l'examen des frottis, nous donnons toutes nos préférences à la fixation par la chaleur *à la condition de ne pas trop prolonger le chauffage* qui, à la longue, peut supprimer toute trace de coloration. Souvent nous n'avons employé aucun moyen pour fixer les préparations. Signalons en passant avec Gierke que la recherche des ferments dans les organes est très gênée par les fixateurs. Ainsi, en nous servant de formol à 1/10 nous n'avons pu obtenir des résultats probants et absolument certains, que pour des organes tels que la glande salivaire, le corps thyroïde et le thymus. Dans les

coupes du foie, du rein et du pancréas nous n'avons observé aucune coloration dans les cellules parenchymateuses sauf une légère teinte diffuse. Cependant même sur les coupes nous pouvions distinguer facilement les polynucléaires, dont la richesse en ferments oxydants est particulièrement élevée.

Ces multiples techniques démontrent que le colorant précipite uniquement au niveau des granulations cellulaires. Elles paraissent constituer de véritables centres de processus, et servent de *pivot d'oxydation*.

Le sang et le pus présentent à ce sujet un champ d'observation particulièrement riche et démonstratif. Schultze s'occupe le premier de cette étude intéressante. Il constate que la réaction est *spécifique* pour les leucocytes de la série myéloïde. Le ferment oxydant « indophénoloxydase » de cet auteur est contenu dans les granulations du cytoplasma. Insistant sur ce caractère tout particulier des éléments leucocytaires de cette série, le savant allemand attire l'attention sur l'importance capitale que peut revêtir cette réaction dans le diagnostic différentiel des leucémies. La leucémie myologène seule pousse la réaction qui devient alors particulièrement évidente.

c) **Aspect de la réaction**. — Quel est l'aspect présenté par les polynucléaires et les myélocytes ? Dans notre article sur les oxydases nous avons donné la description détaillée des leucocytes. Voici le résultat de nos observations ultérieures auxquelles nous ne saurions ajouter

aucun nouveau détail : « sur une lame de sang sèche, « les leucocytes polynucléaires apparaissent remplis de « fines granulations bleuâtres qui, tout d'abord clairse- « mées dans le corps même du leucocyte, ne tardent « pas à bourrer le cytoplasma. Ces granulations se dé- « posent seulement dans le cytoplasma leucocytaire « comme le démontre l'aspect transparent et clair du « noyau. Lorsque les solutions sont très concentrées, « comme dans les solutions au 1/100, les granulations « colorantes ne se montrent pas seulement dans les « leucocytes, mais apparaissent aussi autour des globu- « les rouges et même tardivement entre les éléments « figurés du sang, à cause de l'oxydation progressive et « spontanée du mélange ». (fig. 1).

« Cette réaction est surtout prédominante dans les « polynucléaires neutrophiles. Elle s'observe aussi sur les « polynucléaires l'éosinophiles. Par contre, les mononu- « cléaires sont généralement exempts de toute granula- « tion résultant d'une réaction oxydante, exception ce- « pendant pour certains grands mononucléaires, où peut « se manifester parfois une légère réaction. En somme, « *cette réaction appartient aux leucocytes de la série* « *myéloïde*. Les renseignements fournis par l'étude du « sang dans les états pathologiques viennent confirmer « cette notion du *caractère myéloïde* des leucocytes à « réaction oxydante ».

Avec Schultze on peut distinguer à l'aide de cette réaction les deux types de leucémies : les leucémies lymphoïdes et les leucémies myéloïdes. Dans les pre-

mières la réaction est toujours négative grâce à la présence exclusive des éléments mononucléaires. Par contre les leucémies myéloïdes présentent un aspect tout différent : « tous les myélocytes, tous les polynucléaires et « en général, tous les éléments qui appartiennent à la « série médullaire, donnent une réaction granuleuse des « plus évidentes et qui suffit pour faire le diagnostic de « la nature de la leucémie ». Nous avons eu la confirmation de ce fait dans trois cas différents de leucémie myélogène. Chez nos malades non seulement les myélocytes granuleux donnent la réaction, mais aussi les grandes cellules primordiales à protoplasma basophile et dépourvue de toute granulation apparente. Cette propriété intéressante se retrouve encore dans les globules rouges à noyaux et particulièrement dans les mégaloblastes (fig. 2).

John Dunn attribue ce caractère à toute la série myéloïde et grâce à cette particularité des cellules d'origine médullaire, il étudie la distribution du tissu myéloïde chez le fœtus. Il arrive à cette conclusion que la réaction oxydante précède dans le développement la formation des granulations. Seulement, dans les cellules qui ne sont pas arrivées au terme de leur évolution, la seule différence avec les formes adultes consiste en une coloration plus lente où un volume moins considérable de granulations.

Dans le sang normal tous les leucocytes ne donnent pas la réaction avec la même netteté. Au cours de notre expérimentation nous avons observé plusieurs degrés

d'intensité de la coloration. Il existe des polynucléaires où la réaction est à peine ébauchée. Les leucocytes présentent alors un aspect clair, parsemé de quelques granulations rares et peu volumineuses. Les noyaux ne sont pas colorés, mais ils se distinguent du protoplasma par leur réfringence. A côté de ces polynucléaires pauvres en granulations nous rencontrons des éléments incomparablement plus riches en oxydase. Ceux-là se présentent comme de grandes taches noires constituées par des granulations volumineuses. Les noyaux disparaissent entièrement sous la masse compacte de granulations noires. Tout autour du leucocyte on peut observer quelques granulations extra-cellulaires disséminées irrégulièrement entre les hématies ou les globules blancs. Entre ces deux types de polynucléaires nettement tranchés s'interpose une gamme de stades intermédiaires où il serait très difficile d'indiquer les caractères précis pour les classer dans telle ou telle autre catégorie. Pour ne pas compliquer la question par les descriptions inutiles de types purement artificiels nous conservons uniquement ces deux catégories primitivement adoptées.

d) **Variations pathologiques.**— La fonction d'oxydation dans l'organisme est modifiée par les différents états morbides. Il est possible que cette modification ne se traduise pas par la réaction microchimique des oxydases.

A. Dans le sang.— Nous avons examiné à ce propos le sang de sujets atteints de maladies différentes et voici quels étaient les résultats de nos énumérations :

1° Fièvre typhoïde à la période de convalescence : polynucléaires avec la réaction colorante faible, 26 ; polynucléaires avec la réaction colorante forte, 74.

2° Tabès avec arthropatie du genou droit, réaction faible dans 22 éléments, forte dans 78.

3° Rétrécissement mitral. Réaction faible dans 16 éléments, forte dans 84 .

4° Rhumatisme tuberculeux. Réaction faible dans 8 éléments, forte dans 92.

5° Rhumatisme articulaire aigu avec température très élevée. Réaction faible dans 14 éléments, forte dans 86.

6° Néphrite chronique. Emphysème. Réaction faible dans 6 éléments, forte dans 94.

7° Tuberculose pulmonaire à la troisième période. Hyperthermie. Réaction faible dans 88 éléments, forte dans 12.

8° Tuberculose pulmonaire cavitaire avec anémie : réaction faible dans 54 éléments, forte dans 46.

9° Tuberculose pulmonaire avec broncho-pneumonie caséeuse : réaction faible dans 90 éléments, forte dans 10.

10° Tuberculose pulmonaire. Cachexie : réaction faible dans 80 éléments, forte dans 20 éléments.

11° Tuberculose pulmonaire avec hyperthermie. Deuxième examen : réaction faible dans 8 éléments, forte dans 92.

12° Tuberculose pulmonaire à la troisième période : réaction faible dans 6 éléments, forte dans 94.

13° Tuberculose pulmonaire à la période de ramollissement : réaction faible dans 40 éléments, forte dans 60.

14° Tuberculose pulmonaire, troisième période : réaction faible dans 34 éléments, forte dans 66.

15° Tuberculose pulmonaire : réaction faible dans 6 éléments, forte dans 96.

16° Fièvre typhoïde : réaction faible dans 4 éléments, forte dans 96.

17° Ulcus gastrique : réaction faible dans 6 éléments, forte dans 94.

18° Néphrite chronique. Emphysème. Deuxième examen : réaction faible dans 88 éléments, forte dans 12.

19° Intoxication par les gaz d'égout : réaction faible dans 14 éléments, forte dans 86.

20° Pneumonie chez un tabétique et ancien paludéen : réaction faible dans 8 éléments, forte dans 92.

21° Pneumonie. Abcès de fixation : réaction faible dans 6 éléments, forte dans 94.

22° Intoxication mercurielle : réaction faible dans 1/6 éléments, forte dans 84.

23° Cirrhose atrophique avec cachexie. Purpura intense : réaction faible dans 36 éléments, forte dans 62.

24° Pleurésie séro-fibrineuse : réaction faible dans 14 éléments, forte dans 86.

25° Rhumatisme articulaire aigu avec insuffisance mitrale : réaction faible dans 3 éléments, forte dans 97.

26° Péricardite tuberculeuse et tuberculose pulmonaire : réaction faible dans 1 élément, forte dans 99.

27° Syphilis tertiaire laryngée et osseuse : réaction faible dans 0 élément, forte dans 100.

Il résulte de ces constatations que certains états pathologiques comme la fièvre typhoïde, la tuberculose pulmonaire à la troisième période, le purpura, diminuent le pouvoir oxydant des polynucléaires. Mais à l'heure actuelle il nous est impossible d'être très affirmatif à ce sujet, car les causes d'erreurs sont nombreuses et les résultats d'énumération difficiles à interpréter.

B. Dans le pus. — Le pus présente également un champ d'étude très vaste et très intéressant. La réaction macroscopique y est très nette et rapide. Mais il est très important de se servir uniquement du pus provenant de suppurations aigues et recueillies autant que possible sans trace de sang. Winkler s'est occupé particulièrement de l'étude des ferments oxydants dans ce milieu.

Il remarqua que les leucocytes du sang se colorent de la même manière que les leucocytes du pus. Le frottis du pus se distingue des préparations de sang par l'intensité de la réaction. Tous les globules de pus donnent une coloration bleu-violette intense tandis que les hématies ne prennent aucune coloration, sauf les hématies des anémies pernicieuses qui prennent une teinte violette légère et diffuse. Les gonocoques dans les écoulements uréthéraux ne semblent contenir aucune oxydase. Cette constatation n'est pas dépourvue d'intérêt car Dietrich et Liebermeister signalent l'existence de granulations bleues dans certains bacilles comme par exemple les bacilles de Lœlfler et d'Eberth. Pour Winkler le sang de certains animaux présente quelques

différences avec le sang humain, car les noyaux des polynucléaires de rongeurs se colorent en violet tandis que le protoplasma reste incolore et ne présente point de granulations. Schultze proteste contre cette constatation.

Personnellement nous avons examiné plusieurs variétés de pus des collections aigues et des abcès froids. Dans le pus du pneumothorax fébrile, dans la pleurésie suppurée et dans plusieurs écoulements gonorrhéiques, dans les abcès chauds, la réaction fut toujours fortement positive. Par contre dans le pus des abcès froids tuberculeux à mononucléaires le résultat fut invariablement négatif. Il l'était également avec le pus à polynucléaires fortement altérés comme dans un cas d'abcès de fixation par la térébenthine et avec le pus d'un furoncle laissé à l'air et à la température du laboratoire pendant trois jours. Donc, pour qu'elle se produise, la réaction exige une intégrité relative des leucocytes. Par suite de différents processus cellulaires ou par l'autolyse les ferments oxydants sont détruits ou expulsés en dehors de la cellule. Il nous est arrivé d'examiner des préparations où les polynucléaires ne présentaient aucune granulation colorée, seuls quelques débris nucléaires apparaissaient par ci par là, mais entre ces restes des cellules détruites on trouvait des granulations bleues disséminées et rares. Macroscopiquement ces pus là donnent encore la réaction nette. (Fig. 3.)

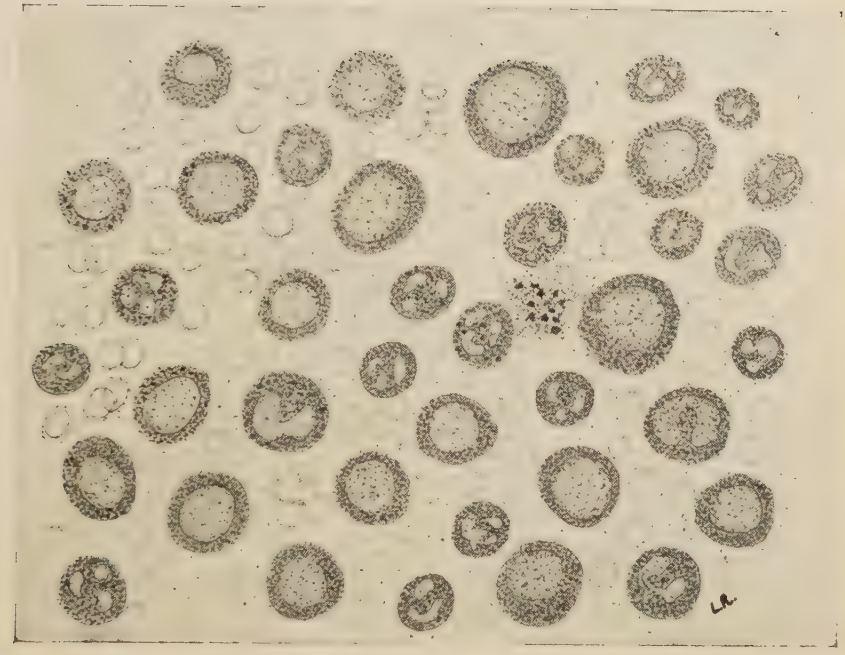

Fig. 2.

Réaction oxydante directe. Sang de leucémie myélogène chronique

Les mononucléaires sont des myélocytes, myélogonies et myélocytes.

Technique { Naphtol α 1/4000
Paraphénylène-diamine 1/1000.

A côté de cette oxydase directe il en existe une autre. Elle se distingue de la première par la faculté qu'elle possède de décomposer l'eau oxygénée et d'utiliser pour les oxydations la molécule d'oxygène dégagé.

2° Les oxydases indirectes

L'existence de ce ferment fut remarquée depuis longtemps. On le dépistait à l'aide de la teinture de gaïac additionnée de quelques gouttes d'eau oxygénée. Une coloration bleue intense se produisait immédiatement dès que l'oxydase était mise en contact avec les réactifs. L'eau oxygénée joue le rôle du produit emmagasinant l'oxygène mis en liberté par l'action du ferment. Dans ces conditions l'oxygène acquiert des pouvoirs oxydants beaucoup plus énergiques qu'à son état normal. Bourquelot classe cette oxydase dans la catégorie des oxydases indirectes. Mais c'est surtout Portier qui s'occupe de l'étude de ce ferment et lui consacre toute une série de travaux remarquablement intéressants. Cet auteur arrive à conclure que ce sont les leucocytes du sang qui contiennent le ferment tandis que les autres éléments n'en contiennent point. La preuve incontestable de la présence de cette oxydase dans les leucocytes fut apportée par Noel Fiessinger et par nous dans notre communication à la Soc. de Biologie et dans l'article publié dans les Archives de Médecine Expérimentale.

Technique. — Nous reproduisons ici la technique telle qu'elle a figuré dans nos publications ultérieures.

« Sur une lame bien étalée, verser une solution à « 2 o/o dans l'alcool absolu de benzidine pure. On laisse « 10 minutes en contact et on fait couler la solution que « l'on remplace par une solution d'eau oxygénée. Cette « eau oxygénée est obtenue en diluant 20 fois l'eau oxy- « génée « Perhydrol » Merck. Quand le sang étalé se « colore en vert pâle, on balaie l'eau oxygénée avec de « l'eau distillée et on sèche rapidement au papier buvard. « On peut faire suivre cette technique d'une coloration « très courte dans une safranine faible.

« Dans cette technique, nous tenons à insister sur « plusieurs détails importants :

« 1° *L'acidité de l'eau oxygénée.* — Nous avons ob- « servé que les eaux oxygénées fortement acides ne « donnaient pas d'aussi belles préparations que les eaux « faiblement acides, comme le « Perhydrol » (que nous « avons toujours trouvé acide, malgré l'affirmation de « son étiquette). Mais entre les eaux faiblement acides, « les eaux légèrement alcalines et les eaux neutres, il n'y « a pas notable différence.

« 2° *La concentration de l'eau oxygénée.* — Ici nous « touchons un des points les plus curieux de nos recher- « ches. Si l'eau oxygénée est trop concentrée (20 volu- « mes, 30 à 50 volumes), il se produit deux ordres de « réaction qui empêchent l'observation des résultats que « nous cherchons : fréquemment, les leucocytes poly- « nucléaires éclatent sous l'effet d'un gros dégagement « d'oxygène ; d'autre part les hématies se colorent for- « tement en bleu et semblent fixer dans cette coloration

« tout l'oxygène mis en liberté, au détriment des leuco-
« cytes, Aussi, sommes-nous arrivé à cette conclusion
« pratique : Si, durant notre réaction, des bulles d'O se
« dégagent au moment de l'application de H^2 O^2 on peut
« être certain que les leucocytes ne vont pas présenter
« de réaction microchimique. Pour obtenir une telle
« réaction, il faut une H^2 O^2 très diluée et il faut que les
« globules rouges restent entièrement étrangers à la
« réaction. Cette constatation n'a pas qu'un intérêt tech-
« nique, elle nous semble préciser nettement un degré
« dans ce que nous appellerons la *puissance catalytique*.
« Les éléments du sang se divisent en deux espèces
« d'éléments nettement distincts : les *éléments à puissance*
« *catalytique* faible : ce sont des *hématies*, qui agissent
« plus par leur constitution ferrugineuse que par une
« véritable oxydase ; et des *éléments à puissance catalyt-*
« *tique forte* : ce sont les leucocytes qui, nous le dé-
« montrerons, agissent à l'aide d'une oxydase-ferment.
« Les premiers ne peuvent manifester leur présence que
« si l'eau oxygénée est très concentrée ; les seconds
« bleuissent la benzidine avec des solutions très diluées
« au point que les hématies se teintent à peine.

3° *La concentration de la benzidine*. — Les titres
« de 1 à 2 o/o sont ceux qu'il faut choisir. Inutile d'em-
« ployer des concentrations plus fortes qui pourraient
« donner des précipités en aiguilles sur les lames de
« sang. »

Aspect de la réaction. — A l'aide de cette méthode

simple et rapide quoique délicate dans les frottis du sang à cause de l'action catalytique des hématies, nous obtenions la preuve démonstrative de l'existence du ferment dans les granulations des polynucléaires et en général dans tous les éléments de la série médullaire. Les mononucléaires et les lymphocytes conservent leur aspect habituel, tandis que les polynucléaires présentent une analogie remarquable avec l'aspect de leucocytes traités par le réactif de Röhmann et Spitzer.

Les polynucléaires apparaissent remplis de granulations tantôt roses et volumineuses comme les granulations des éosinophiles, tantôt petites et abondantes comme dans les neutrophiles. On peut donc conclure avec la plus grande certitude que l'oxydase est contenue uniquement dans les polynucléaires au niveau des granulations protoplasmiques qui apparaissent alors comme des centres importants, de véritables pivots du processus vital d'oxydation (fig. 4).

Cependant il est possible de voir quelques ponctuations bleues épanchées entre les globules de pus ou les hématies, mais on ne constate ce phénomène que lorsque la réaction est poussée trop loin. Dans ce cas les granulations se gonflent, font éclater les polynucléaires et se dispersent au voisinage de l'élément qui les contient. Plus tard elles disparaissent entièrement, le protoplasma incolore s'efface et, comme unique vestige de leucocytes détruits, il reste quelques débris nucléaires légèrement teintés en vert. Par contre les hématies prennent une coloration bleue intense, que nous avons signa-

lés plus haut en l'expliquant par la catalyse produite par les composés ferrugineux du sang.

Au cours de notre expérimentation nous avons eu l'occasion d'examiner le sang de leucémie myéloïde. La netteté de la réaction pouvait être facilement appliquée pour le diagnostic différentiel des variétés de leucémie. Ici la réaction est encore entièrement comparable à celle obtenue par le réactif de Röhmann et Spitzer.

Application diagnostique.— L'intérêt de la découverte des oxydases dans les leucocytes s'étend plus loin que le domaine de la biologie et de la physiologie, il trouve également une application pratique en clinique. Nous avons insisté longuement sur le caractère de la réaction propre uniquement aux éléments de la série myéloïde. Schultze fut le premier à appliquer cette propriété pour le diagnostic différentiel des leucémies. Au cours de cette affection l'intensité de la réaction est telle que, même sur les coupes d'organes, où la recherche des oxydases est quelquefois délicate, il est facile de retrouver les leucocytes présentant des granulations bleues caractéristiques. Ainsi l'auteur retrouve des oxydases dans la rate, dans la moelle osseuse, et dans le foie. Dans les coupes du foie les cellules d'origine médullaire sont particulièrement nettes. Elles remplissent les espaces portes, les capillaires et les vaisseaux de calibre plus important. Enfin elles pénètrent également dans l'intérieur du lobule sans que les cellules parenchymateuses participent à la coloration.

En dehors de la leucémie l'auteur allemand propose d'appliquer la réaction pour différencier les tumeurs et les processus inflammatoires.

On peut objecter à ce moyen de diagnostic une technique difficile et minutieuse exigeant une attention particulièrement éveillée sur l'état de conservation des réactifs.

G. Carrière de Lille constate la présence des oxydases indirectes dans les liquides normaux et pathologiques. Pour affirmer la présence des oxydases il se base 1° sur le dégagement d'oxygène, 2° sur la réaction au gaïacol, 3° sur la disparition du phénomène après ébullition du liquide. A l'aide de ces méthodes il arrive aux conclusions suivantes :

Les urines contiennent des oxydases indirectes surtout au cours du mal de Bright, dans les deux premières périodes de la tuberculose pulmonaire et enfin dans quelques processus pulmonaire à l'évolution aiguë.

Le sang présente des oscillations dans la teneur en ferments, ainsi dans un cas d'urémie et chez un cardiaque asystolique, les oxydases furent diminuées tandis qu'elles paraissaient plus abondantes dans la bronchopneumonie, dans l'érythème infectieux, dans la tuberculose fébrile et dans la paralysie générale.

Les crachats sont généralement riches en oxydases, peut-être à cause de la présence du ferment dans les glandes salivaires. Au cours de la tuberculose pulmonaire elles augmentent encore pour diminuer dans la pneumonie et dans la bronchite.

L'ascite est peu riche en oxydases.

Le liquide pleural en contient incontestablement.

Le liquide du kyste de l'ovaire est dépourvu de ce ferment ainsi que le suc gastrique.

Le lait de femme contient des traces de ferments oxydants.

Récemment Marfan, Ménard et Saint-Girons ont attiré l'attention sur l'importance que peut acquérir la constatation des oxydases en clinique. Les auteurs nomment ce procédé peroxydo-diagnostic. Il est basé sur la propriété qu'ont les oxydases indirectes de décomposer l'eau oxygénée.

Voilà comment procèdent les auteurs.

Comme réactif ils se servent de la solution aqueuse du gaïacol indiqué par Bourquelot. On mélange dans un tube à essence une solution de gaïacol à 1 o/o avec l'exudat à examiner, les liquides sont mélangés en parties égales, on ajoute quelques gouttes d'eau oxygénée et si le liquide contient des oxydases, une coloration bleue se produit presque immédiatement. La réaction est constante toutes les fois qu'il y a des polynucléaires en quantité appréciable. L'hémoglobine du sang contribue également à la production de la coloration. C'est la seule cause d'erreurs possibles, mais en pratique il suffit de ne pas se servir du liquide qui, microscopiquement, contient du sang en très petite quantité ne détermine aucune coloration.

Grâce à sa rapidité et à son exécution facile le peroxydodiagnostic peut devenir en clinique un moyen auxi-

liaire précieux pour instituer une thérapeutique précoce et active comme par exemple dans la méningite cérébro-spinale où le liquide céphalo-rachidien garde une apparence normale et où le cytodiagnostic seul peut donner une indication. Dans ce cas le péroxydo-diagnostique peut remplacer l'examen cytologique : « La peroxydase « révélée par la réaction de Bourquelot paraît toujours « liée à la présence des polynucléaires ; elle a la même « valeur que la constatation microscopique de ces cel- « lules ».

Sur 44 examens de liquide céphalo-rachidien, 13 liquides normaux cytologiquement donnèrent la réaction négative. Dans 14 cas de lymphocytose le résultat était pareil. Dans 7 cas de méningite tuberculeuse 5 fois la réaction était négative et la cytologie a démontré une lymphocytose nette, une fois seulement la formule leucocytaire était mixte et la réaction péniblement positive. Enfin dans un cas de polynucléose la réaction était franchement positive. 7 cas de méningite aigu à méningo et pneumocoques donnèrent des résultats positifs. Dans un cas de coma de valeur indéterminée la réaction était nulle. Finalement dans un liquide provenant d'un cas de fracture du crâne avec hémorragie la réaction était faiblement positive ainsi que dans l'hémorragie méningée.

L'urine, l'épanchement pleural et le pus donnaient des réactions identiques : positives en présence de polynucléaires, négatives dans d'autres circonstances.

Ainsi la constatation de la péroxydase devient un

moyen de diagnostic important ayant presque la valeur du cytodiagnostic et même dans certains cas capable de le suppléer avantageusement.

V. Rôle des oxydases en physiologie pathologique

Le ferment oxydant joue incontestablement dans la physiologie cellulaire un rôle important, il tient également une place non moins importante dans la pathologie générale.

Toute cellule vivante si simple qu'elle soit dans sa structure est en réalité une organisation compliquée, douée de forces très diverses. Certainement l'action diastasique est la plus importante et la plus vaste, car en somme, toutes les fonctions capitales de la vie d'un organisme sont produites par les diastases. Pour Duclaux les diastases « peuvent faire à peu près tout ce « que peuvent faire les cellules vivantes quelles qu'elles « soient. Arrêter au passage les aliments convenables « en les coagulant, se délivrer de ce qui est devenu inu- « tile en le liquéfiant et lui permettant de s'écouler, « faire respirer la cellule, fabriquer du simple avec du « complexe comme dans toutes les digestions ou refaire du complexe avec du simple comme dans tous les phéno- « mènes de synthèse organique ».

Parmi les diastases l'oxydase est un ferments des plus actifs. Duclaux le considère comme une diastase de la respiration. Mais il semble peu probable que les oxydases puissent agir directement sur les matières organiques. Par contre leur intervention dans l'acte de défense de la cellule et de l'organisme entier est évi-

dente. Les oxydases acquièrent une importance plus considérable et plus étendue depuis la découverte d'Abelous et Aloy qui démontrent que dans l'organisme animal le même ferment accomplit les actes d'oxydation et de réduction. Ces auteurs lui donnent le nom d'oxydo-réducteur. Le professeur Armand Gautier partage cette manière de voir. Il admet que les phénomènes d'hydratation et de dédoublement préparent l'oxydation.

Quels sont les effets physiologiques de ces diastases organiques sur la nutrition? La réponse à cette question nous la trouvons dans le livre du professeur Albert Robin sur les ferments métalliques. La diastase de la levure de bière injectée à la dose de 2 à 5 cc. produit dans tout l'organisme des modifications aussi nombreuses qu'importantes. L'examen d'urine pratiqué par la méthode grossière et rapide au lit du malade fait déjà constater les phénomènes suivants : 1° une apparition temporaire d'un léger disque d'albumine ; 2° une augmentation de l'acide urique ; 3° une élimination en quantité considérable d'indoxyle ou de scatoxyle, et 4° une décharge d'urée se manifestant par l'apparition de cristaux de nitrate d'urée. Toutes ces manifestations sont particulièrement intenses dans certains états pathologiques comme par exemple dans la pneumonie, dans la grippe et dans le rhumatisme articulaire aigu.

L'examen chimique des urines indique l'action de la diastase sur la nutrition qui se traduit par la suractivité des échanges organiques parallèle à la diminution des

échanges inorganiques ; les échanges azotés sont augmentés, comme l'indique l'élévation des chiffres de l'azote total et de l'urée ; l'acide urique s'élève dans des proportions considérables et prouve un surcroît d'activité leucocytaire et une désassimilation des organes riches en nucléine ; les matières ternaires qui ont subi une oxydation très incomplète augmentent dans des proportions appréciables. Par contre la quantité d'acide phosphorique diminue.

Les échanges respiratoires sont également influencés par les diastases. Les tableaux que donne M. le Professeur Robin et que nous reproduisons ici sont particulièrement démonstratifs.

TABLEAU N° III. — *Action des diastases de la levure sur les échanges respiratoires* (1er cas)

(2 centimètres cubes de diastase dégagent 2 volumes d'oxygène par centimètre cube)

ÉLÉMENTS du chimisme respiratoire	AVANT la période des injections Moyen. de 4 jours	PENDANT la période des injections Moyen. de 8 jours	APRÈS la période des injections Moyen. de 4 jours	VARIATIONS pour 100 AVANT	VARIATIONS pour 100 APRÈS
Ventilation pulm. par kil.-minute...	74cc 26	66cc 85	66cc 16	— 10 »	— 10,89
Acide carbonique produit.....	2cc 32	2cc 28	2cc 22	— 1,72	— 4,31
Oxygène total consommé.....	2cc 95	2cc 50	2cc 79	— 15,29	— 5,42
Oxygène consommé par les tissus...	0cc 63	0cc 32	0cc 57	— 49,20	— 9,52
Totalité des échanges.....	5cc 27	4cc 78	5cc 01	— 9,29	— 4,93
Quotient respiratoire.....	0,786	0,912	0,795	+ 16,03	— 1,14

TABLEAU N° IV

Action des diastases de la levure sur les échanges respiratoires

(2 centimètres cubes de diastase dégageant 6 volumes d'oxygène par centimètre cube.)

ÉLÉMENTS du chimisme respiratoire	AVANT la période des injections — Moyenne de 4 jours	PENDANT la période des injections — Moyenne de 8 jours	APRÈS la période des injections — Moyenne de 4 jours	VARIATIONS p. 100 PENDANT	VARIATIONS p. 100 APRÈS
Ventilation pulm. par kil.-minute.	164cc,3	150cc,6	144cc,2	— 8,33	— 12,23
Acide carbonique produit.....	3cc,72	3cc,096	3cc,57	+ 6,45	— 4,03
Oxygène total consommé.....	3cc,97	3cc,74	3cc,78	— 5,79	— 3,78
— consommé par les tissus	0cc,25	0	0cc,21	— 100 »	— 16 »
Totalité des échanges.....	7cc,69	7cc,70	7cc,35	»	— 4,42
Quotient respiratoire.....	0,936	1,058	0,944	+ 13,03	+ 0,85

(Les deux tableaux sont reproduits du travail du Professeur Albert Robin sur les ferments métalliques Paris 1907 Rueff, éditeurs.)

Toutes les modifications du chimisme respiratoire se traduisent par une diminution de la ventilation pulmonaire, diminution de l'oxygène consommé total et de l'oxygène consommé par les tissus. Donc la totalité des échanges est diminuée et le quotient respiratoire est augmenté. De plus dans le cas illustré par le second tableau l'acide carbonique augmente légèrement. La formation de l'acide carbonique en quantité supérieure, la diminution de la consommation d'oxygène, son utilisation plus parfaite indiquent qu'une certaine quantité d'oxygène est empruntée à l'organisme et que dans ce processus complexe les oxydases et les peroxydases leucocytaires ont dû intervenir.

On peut conclure également que les diastases de la levure de bière possèdent des propriétés favorisant les phénomènes d'hydratation oxydo-réductrice et peuvent être prises comme type de ferment oxydant.

Tels sont les effets des ferments au point de vue de la nutrition mais leur rôle est non moins étendu dans un autre domaine. Les oxydases tiennent une place importante dans la défense de l'organisme. Ce rôle de l'oxydase fut envisagé pour la première fois par Paul Portier en 1897 dans sa thèse inaugurale. L'auteur s'élève contre une opinion qui à son époque proclamait l'existence de l'oxydase dans le sang et dans les tissus glandulaires, comme par exemple dans le parenchyme hépatique que Abelous et Biarnès considéraient comme organe particulièrement riche en ferment oxydant. Pour Portier l'oxydase est liée aux leucocytes qui seuls contiennent

le ferment. L'oxydase n'existe ni dans le sang circulant ni dans les tissus de l'animal vivant. Elle est mise en liberté par les leucocytes au moment de leur mort. Ces oxydases isolées des tissus animaux et végétaux ne sont pas capables de produire dans l'organisme des oxydations cellulaires dans le but d'entretenir l'énergie vitale. Leur rôle physiologique se borne uniquement à défendre l'organisme contre l'envahissement des micro-organismes. L'auteur ne peut pas dire si l'oxydase intervient d'une manière active dans le phénomène de phagocytose car il n'a jamais réussi à faire ingérer aux phagocytes des grains de gaïac. La question de la physiologie du ferment a suscité d'autres expérimentations et nous pouvons citer à cette occasion les travaux très intéressants sortis de l'école du Professeur Nencki.

A ce sujet, les articles de Mmes N. Sieber et Szoumov-Szimanowski méritent une attention toute particulière en raison du sujet traité et les résultats acquis par leur expérimentation. Nous ne pouvons nous étendre sur les travaux faits par ces auteurs et nous nous bornons à citer leurs conclusions. Les oxydases d'origine animale ou végétale neutralisent les toxines du tétanos et de la diphtérie. Cette action destructive des oxydases vis-à-vis des toxines *in vitro*, s'observe également dans l'organisme vivant. Si on pratique à un animal une injection sous-cutanée d'un mélange de toxine et d'oxydase, l'action des diastases oxydantes supprime l'influence néfaste de la toxine. Cette action se produit également si on injecte à l'animal la toxine et l'oxydase

séparément. L'animal résiste alors à des doses mortelles de toxine. Une seule condition doit être observée. Mme Sieber insiste sur ce fait « la destruction des toxi-« nes par les émulsions contenant des oxydases a lieu « seulement dans les cas où ces émulsions donnent des « réactions colorantes caractéristiques pour les oxydases. « Par contre, lorsque la réaction avec la teinture de gaïac « est négative l'émulsion n'exerce aucune action sur les « toxines ».

L'effet destructif des oxydases par rapport aux toxines diphtérique et tétanique peut être obtenu par certaines préparations artificielles ; ainsi Mme N. Sieber signale que le bioxyde de calcium et l'eau oxygénée sont capables de détruire les deux toxines qui ont servi à l'expérimentation. Cette dernière notion a son importance au point de vue thérapeutique.

Auguste et Louis Lumière et Chevrottier répètent les expériences de Mme Sieber et arrivent à des conclusions identiques.

Un autre auteur russe, Seowtsoff étudie les ferments oxydants dans la glande salivaire et voici à quelles conclusions il arrive au sujet de leur rôle. L'oxydase de la salive possède une action chimiotaxique positive très puissante pour les leucocytes dans la cavité buccale et dans tout le tube digestif au moment de l'acte digestif. L'oxydase de la salive est recueillie et portée par les leucocytes avec le courant sanguin dans les glandes telles que le foie. Là son pouvoir oxydant peut être utilisé à des transformations importantes aux-

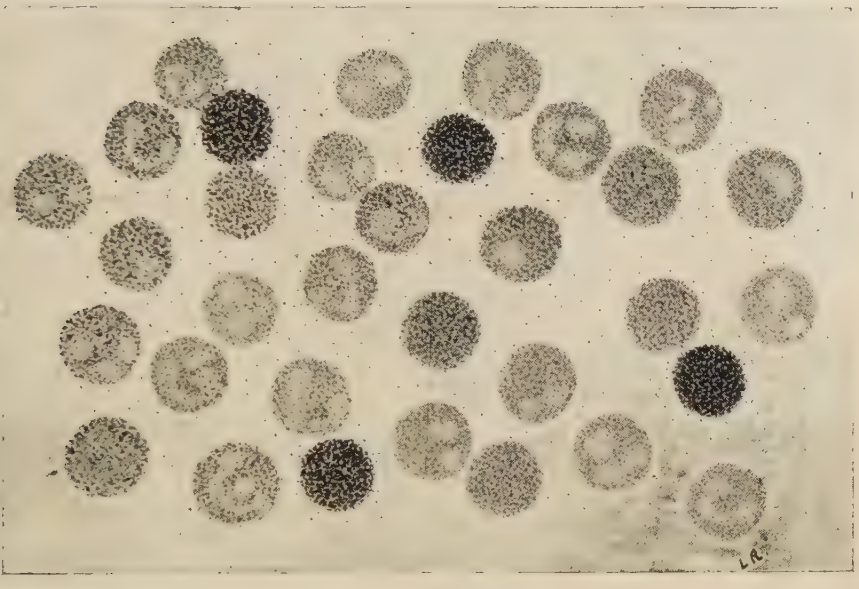

Fig. 3

Réaction oxydante directe dans le pus gonococcique

Technique de Schultze

quelles l'oxygène apporté par le sang artériel ne suffit pas. Peut-être que le ferment oxydant est employé à renforcer l'acte d'oxydation.

En étudiant la même oxydase de la sécrétion salivaire et lacrymale Richard-Spanjer-Herford suppose que le ferment possède une action bactéricide et qu'il agit à la manière des solutions antiseptiques. Par conséquent son action serait une manifestation locale de défense antimicrobienne.

Il est évident aujourd'hui que le rôle des oxydases est complexe. Elles interviennent à la fois comme des agents actifs dans la nutrition cellulaire et dans la défense de l'organisme contre ses nombreux et puissants agresseurs. La thérapeutique dans l'emploi des diastases inorganiques comme moyens curatifs dans de multiples affections fournit un argument de plus à l'appui de cette idée.

VI. **Rôle des oxydases en thérapeutique.**

Au cours des travaux sur le latex du Rhus Succédanea Gabriel Bertrand découvre que le pouvoir oxydant de la laccase est en rapport direct avec sa teneur en manganèse. Le savant cherche alors si certains sels de manganèse n'ont pas les propriétés des oxydases, et il conclut que le manganèse est le véritable agent actif des phénomènes d'oxydation, la matière albuminoïde de la diastase ne jouerait qu'un rôle tout à fait secondaire.

Trillat est venu apporter de nouveaux documents. Pour lui le manganèse de la laccase sert uniquement à

transporter l'oxygène sur certains composés organiques. Il attribue également aux albuminoïdes un rôle actif qui consisterait à maintenir le métal de l'état colloïdal. D'autre part il prépare une oxydase artificielle en associant le manganèse, l'albumine et l'alcali. Cette diastase artificielle possède tous les caractères des oxydases. Donc, les expériences de Trillat sont venues confirmer les constatations de Bertrand au sujet de l'influence du métal dans le ferment. Il ajoute seulement que, la matière protéique joue un rôle important en empêchant la participation du métal qu'elle maintient à l'état colloïdal nécessaire à son rôle d'oxydant.

Qu'est-ce donc que l'état colloïdal et la solution colloïdale ?

Les colloïdes sont des substances qui sont constituées par des molécules très volumineuses et incapables de dialyser. Il existe des *colloïdes naturels* comme par exemple les matières protéiques, le glycogène, la gomme et les *colloïdes artificiels* préparés par divers procédés de laboratoire. Les colloïdes artificiels ou les solutions colloïdales présentent plusieurs caractères invariables : 1° A l'ultra-microscope on voit de fines particules en suspension dans le liquide qui macroscopiquement paraît homogène ; 2° Les points de congélation et le point d'ébulition des solutions colloïdales ne diffèrent en rien du point de congélation et d'ébulition du solvant ; 3° Avec le temps les solutions colloïdales finissent toujours par abandonner leur colloïde ; 4° Enfin elles exercent une action comparable à

celle des diastases. Ce dernier caractère leur a valu le nom de *diastases inorganiques*.

La préparation des diastases inorganiques est facile à effectuer soit par la voie chimique (préparation d'organosol) soit par la voie électrique (préparation d'hydrosol). Nous n'insistons pas sur les détails de la préparation et nous passons directement à l'étude des propriétés des ferments métalliques. Les propriétés des solutions métalliques (ou plutôt pseudo solutions, car le métal est en suspension) ne varient pas avec le métal employé. Les ferments métalliques à l'exemple des ferments solubles ont un pouvoir catalyseur considérable ; la température élevée diminue leur action et la supprime même complètement au-delà de 75° ; la teinture de gaïac mise en présence des ferments métalliques donne une belle coloration bleue. Enfin ces ferments sont sensibles à l'action de différents produits toxiques qui agissent comme des poisons et peuvent même « tuer » le ferment comme d'autres substances sont capables de le « guérir ». Ainsi l'acide prussique et le sublimé empoisonnent le ferment.

Les hydrosols, solutions préparées pour la première fois par Bredig ne sont pas très stables ; au-delà d'un certain taux la solution « casse » et le métal précipite. Toute tentation de stérilisation tue le ferment ; l'intoxication supprime très rapidement ses propriétés thérapeutiques. Examinée à l'ultra microscope la solution prend un aspect particulier. D'après le Professeur

Albert Robin elle serait comparable « à un ciel étoilé, et « cette ressemblance est d'autant plus saisissante que « chaque grain est animé d'une sorte de scintillement, « d'un mouvement vibratoire, d'un *mouvement brownien* « d'autant plus vif que le grain est plus petit ».

L'action physiologique des ferments métalliques est comparable sur toute la ligne à l'action des diastases organiques. Une injection hypodermique du ferment métallique augmente les échanges organiques et le coefficient d'utilisation azotée, l'acide urique est éliminé en quantité plus considérable, le coefficient de toxicité urinaire est diminué.

En collaboration avec P.-E. Weil, le Professeur Robin étudie l'influence exercée par les ferments métalliques sur les éléments figurés du sang. Ils constatent que l'injection du ferment est suivie d'une leucolyse souvent considérable, surtout dans les affections accompagnées de leucocytose abondante. Cette destruction leucocytaire se fait aux dépens des polynucléaires neutrophiles et survient après la phase de leucocytose. Par contre les globules rouges ne subissent aucune modification. Cette question intéressante de l'action du ferment sur les éléments figurés du sang a été reprise récemment dans le service du Professeur Robin par Manoukhine, Noël Fiessinger, Krolunitsky ; les auteurs arrivent aux conclusions suivantes :

1° Une injection intraveineuse des ferments métalliques provoque d'abord dans le sang du sujet sain une légère hypoleucocytose suivie bientôt d'une hyperleuco-

cytose sans aucune production de leucocytolysines.

2° Dans la pneumonie et dans le rhumatisme articulaire aigu l'hypoleucocytose est bien plus prononcée que chez le sujet normal et s'accompagne de la production dans le sang d'une faible quantité de leucocytolysines. Donc l'injection du ferment possède le grand avantage de stimuler les organes leucocytopoïétiques et leucocytolytiques.

Les réactions leucocytaires produites par l'action des métaux colloïdaux ont été longuement étudiés par Etienne. Il est arrivé à la conclusion suivante : une injection d'argent colloïdal électrique produit un abaissement très sensible de la quantité des leucocytes et cette baisse porte surtout sur les polynucléaires. L'auteur interprète la diminution du taux leucocytaire comme une réaction de défense analogue à l'abaissement leucocytaire qui se produit lorsqu'on injecte expérimentalement une culture microbienne.

L'auteur a demandé avec M. Perrin que la formule leucocytaire au cours d'une pneumonie à la phase précritique et caractérisée par une augmentation du nombre des lymphocites. Pour Etienne elle constitue l'élément essentiel de la leucocytose précritique qui traduit l'effort fait par l'organisme pour enrayer définitivement le processus infectieux. L'injection d'un métal colloïdal produit les mêmes effets et ils se maintiennent pendant toute la durée de l'action du métal colloïdal. Par contre la polynucléose paraît être une réaction mesurant l'infection, et plus elle est élevée, plus le cas est grave.

Une injection de l'Ag. colloïdal abaisse par la leucolyse générale le chiffre des polynucléaires, mais leur quantité remonte ensuite lorsque l'action du traitement est épuisée. Etienne explique ce phénomène par l'adaptation de l'organisme à la lutte ; si l'intoxication est plus faible, le nombre des globules blancs en circulation est proportionnellement moins élevé, mais une intoxication plus grave produit une plus grande réaction des organes hématopoïétiques et une production considérables des leucocytes.

Les variations que subissent les leucocytes ont une influence capitale dans la défense de l'organisme contre l'infection et les intoxications. On peut supposer avec le Professeur Albert Robin qu'une partie des effets obtenus provient de l'action des ferments métalliques sur les leucocytes. Une abondante élimination de l'acide urique dérive des nucléines mises en liberté par la décomposition des globules blancs. Au cours de la leucémie aiguë les urines renferment une grande quantité d'acide urique qui augmente encore lorsqu'il se produit une brusque leucolyse. Les deux phénomènes semblent exister et la conclusion tirée de ce fait par le Professeur Robin nous semble très juste, aussi nous la rapportons textuellement : « Les leucocytes sont, comme on le sait parti-
« nemment des vecteurs des ferments solubles, et des
« ferments mis en liberté par la leucolyse, manifestent
« leurs effets dans l'organisme, en agissant comme
« hydratants oxydo-réducteurs. Ces ferments sont les
« metteurs en train des actes qui aboutissent à la for-
« mation de l'urée et de l'acide urique ».

Les échanges respiratoires sont profondément modifiés par les ferments métalliques. Ici encore nous observons le parallélisme absolu avec l'action des diastases. a) L'oxygène consommé par les tissus diminue, b) le quotient respiratoire s'élève, c) l'acide carbonique diminue, mais cette diminution n'est pas en rapport avec les modifications de l'O^2 total dont la diminution est plus considérable que celle de l'acide carbonique dégagé. Donc si l'organisme n'a pas pris de l'oxygène dans l'air il devient probable alors qu'à l'aide des oxydases l'organisme est allé puiser l'oxygène dans ses propres réserves.

Les actes d'oxydation engendrés par les ferments métalliques semblent intervenir dans un autre cas qui a été également envisagé par le Professeur Albert Robin. L'auteur se demande si le ferment métallique ne pouvait exercer un rôle important dans les intoxications.

Prenons, par exemple, l'intoxication par la morphine. Introduite dans l'organisme la morphine subit des transformations aboutissant à son oxydation plus ou moins complète, mais la toxicité de ce produit nouveau, l'oxydimorphine, est incomparablement moins grande. Il est probable que l'introduction de la morphine produit de la part des diastases une réaction de défense, et que l'accoutumance du sujet se réalise d'autant mieux que l'individu produit plus facilement des diastases oxydo-réductrices capables de transformer la morphine. Quand la réaction de défense manque ou se trouve insuffisante les accidents d'intoxication éclatent.

Le Professeur Albert Robin pratique l'expérience suivante. On fait à un sujet non habitué à l'usage de la morphine une injection d'alcaloïde à dose suffisante pour produire l'hypnose. Quelques jours après on renouvelle l'injection mais en même temps on injecte 10 centimètres cubes d'une solution de ferment métallique. Le sommeil ne se produit pas : l'action de la diastase métallique est venue s'opposer à l'oxydase organique en supprimant l'effet nocif de la morphine.

L'action anti-infectieuse et antitoxique des ferments métalliques justifie amplement la place importante qu'occupent ces solutions colloïdes dans la thérapeutique et le mérite de cette découverte revient au professeur Robin et à ses collaborateurs.

Il résulte de leurs constatations que l'action dominante des ferments métalliques est la stimulation des phénomènes d'hydratation oxydo-réductrice et c'est elle qui règle les indications thérapeutiques de l'emploi des ferments en clinique.

Parmi les maladies justiciables du traitement par les ferments métalliques la pneumonie occupe la première place. L'étude des échanges organiques dans la pneumonie démontre que la crise coïncide avec une exagération de tous les actes chimiques hydratants et oxydo-réducteurs. Ils se traduisent par la production d'une élimination massive d'urée et d'acide urique que le professeur Robin appelle les décharges précritiques. Ils se manifestent également par l'élévation du coefficient de l'utilisation azotée et par la diminution de la consommation totale de l'oxygène.

Il est intéressant de remarquer la similitude qui existe entre les phénomènes chimiques traduisant l'acte de défense de l'organisme dans la pneumonie, et l'action des diastases organiques et artificielles. Cette analogie, incontestablement existante est une raison suffisante pour introduire dans la thérapeuthique les ferments métalliques. L'action des ferments se manifeste également par la production de la leucolyse et par l'influence qu'ils exercent sur la tension sanguine et sur la température.

Une injection de ferment métallique provoque momentanément une élévation thermique, mais la courbe générale des températures du matin et du soir s'abaisse sensiblement. La défervescence thermique définitive se produit plus rapidement sous l'influence de ce traitement que dans les cas habituels. La tension artérielle subit une augmentation passagère qui se maintient ensuite dans la majorité des cas, jusqu'à la défervescence où elle baisse également.

Le ferment métallique, de même que le sérum antidiphtérique, le sérum normal du cheval, les réductases de la levure de bière, produit toutes les manifestations dont nous venons de parler. Manoukhine recueille dans la bibliographie de nombreux cas où la crise pneumonique se trouve précipitée par d'autres substances que le ferment métallique, et cela peut être expliqué par l'influence stimulante du traitement employé. Deux conditions seulement sont indispensables à la production de la crise : d'abord une accumulation considérable des

leucocytes chargés de différents ferments et ensuite la mise en liberté de ces ferments par la leucocytolyse.

Noël Fiessinger, Manoukhine et Krolunitzky démontrent que l'injection des ferments métalliques présente le grand avantage de stimuler simultanément les organes leucocytopoïetiques. La leucocytolyse met en liberté les oxydases des globules blancs qui produisent leurs transformations chimiques avec un telle rapidité qu'au moment où la défervescence thermique se produit, et où les phénomènes urinaires apparaissent, les signes stethoscopiques de la pneumonie ne se modifient point. En un mot le ferment agit sur l'infection et reste sans action sur les lésions pneumoniques.

L'action des ferments métalliques est des plus nettes également dans le rhumatisme articulaire aigu. Sous l'influence de ce traitement la température tombe, la douleur est atténuée dès la première injection et la durée de la maladie est sensiblement plus courte. Dans les cas graves, avec des complications endo-péricardiques, les effets des ferments sont très appréciables sur la maladie causale et sur la cardiopathie créée. Dans le rhumatisme pseudo-infectieux, et en particulier dans le rhumatisme blennorragique, les effets du traitement par les ferments sont particulièrement favorables. L'observation d'une péricardite gonococcique avec épanchement, publiée en 1912 par le Professeur Robin et Noël Fiessinger, est un exemple des plus démonstratifs.

Aujourd'hui, les observations des malades traités par les ferments métalliques sont nombreuses et les

résultats incontestables. Nous les trouvons réunis par le Professeur Robin et G. Bardet par Pierre Sée et Laire. Enfin nous-mêmes, en suivant journellement les malades dans le service du Professeur Robin, nous avons pu juger des effets et des avantages de ce traitement.

CHAPITRE II

Étude de la protéase

I. **Étude générale**. — Dans l'étude de ce ferment le nom de Metchnikoff doit être cité en premier lieu, car il donne les premières notions sur la phagocytose qui constitue la base réelle d'une expérimentation nouvelle. L'action microbicide exercée par les leucocytes est le résultat d'une digestion intracellulaire des éléments phogocytés. L'éminent savant attribue cette digestion intracellulaire à l'action d'un ferment digestif des phagocites. La preuve évidente de ces constatations fut apportée très peu de temps après par toute une série de travaux et d'expériences. La phagocytose microbienne est surtout l'apanage de polynucléaires, et elle s'exerce contre la charpente albuminoïde des micro-organismes. L'histo-chimie appliquée à l'étude de la phagocytose apporte de nouvelles lumières. La vésuvine et le neutralroth permettent des colorations vitales. Grâce à ces colorants, le processus de bactériolyse a été étudié et approfondi. Le neutralroth permet de constater qu'un mi-

crobe vivant reste parfaitement incolore dans le protoplasma du polynucléaire, mais dès qu'il meurt, il prend une coloration rouge et le liquide de la vacuole qui l'entoure présente une réaction acide. Donc la digestion intra-cellulaire est absolument comparable à la digestion extra-cellulaire. Comme toute digestion peptique le processus se passe en milieu acide. Metchnikoff considère cet acte comme l'aboutissant de l'action d'un ferment leucocytaire.

Leber apporte le premier quelques notions précises sur ce ferment. Il établit que les leucocytes possèdent un ferment qui est capable de détruire les tissus nécrosés. Ce pouvoir n'est nullement en rapport avec l'espèce microbienne provoquant la suppuration car le pus aseptique autant qu'un autre pus chargé de bacilles liquéfie la gélatine. Ce pouvoir disparaît après le chauffage à 100°.

En 1899, dans une communication retentissante à la Société de Biologie, Achalme apporte des constatations nouvelles. Il découvre que le pus des épanchements de séreuses et d'autres collections purulentes contient trois sortes de ferments : un ferment protéolytique qui dissout la fibrine et l'albumine de l'œuf coagulé, une caséase qui coagule le lait et enfin une diastase spéciale qui liquéfie la gélatine. Cette dernière diastase, rare dans le pus de séreuses, semble être abondante dans le pus des abcès sous-cutanés. L'auteur se demande quelle est l'origine de ces ferments. Il conclut que ce ne sont pas les microbes qui leur donnent naissance car, leur pré-

sence reste invariable suivant l'élément pathogène ; la diastase existe également dans les collections purulentes aseptiques. Ce n'est pas non plus le sérum qui élabore le ferment car il est environ vingt fois moins actif que le magma leucocytaire. D'autre part, la quantité de ferment est en raison directe de la quantité de leucocytes.

Après cette communication l'école allemande s'occupe particulièrement du ferment. Ces auteurs semblent ignorer les travaux antérieurs et découvrent à nouveau le ferment leucocytaire dans la sang de leucémies myélogènes. En 1903, d'abord Erben puis Schumm, constatent une quantité considérable de peptone et d'albumose dans le sang de leucémie myéloïde après un séjour de soixante-dix heures à l'étuve. Le sang normal et celui de la leucémie lymphogène contient la peptone et les albumoses en quantité négligeable.

Opie, en Amérique, fait quelques nouvelles constatations. Il signale la présence du ferment protéolytique dans la moelle osseuse du chien et dans le pus des abcès. Il le constate également dans les leucocytes des exsudats, et même il entrevoit l'influence favorable exercée par l'alcalinité du milieu, sur le pouvoir digestif du ferment et l'action défavorable du sérum sanguin.

Enfin Müller et Jochmann étudient le ferment protéolytique dans le sang des malades atteints de leucémie myélogène. Les deux auteurs et leurs collaborateurs publient toute une série d'articles très intéressants. Ils ont le mérite d'introduire une technique simple et facile

à employer pour remplacer le procédé chimique compliqué et rempli de causes d'erreurs. Ils remarquent que les liquides qui contiennent les globules blancs, déposés en fines gouttelettes sur des plaques de sérum coagulé et laissés ainsi à l'étuve à 55° pendant 24 à 48 heures, exercent une action digestive au niveau de chaque gouttelette. Le ferment liquéfie le sérum coagulé en y creusant des cupules arrondies qui, par leur aspect, rappellent les « trous du fromage de gruyère ». Ce phénomène de digestion fut observé par Muller et Jochmann avec le sang de la leucémie aiguë et avec la moelle osseuse broyée. Par contre, de nombreuses expériences faites avec le sang normal, avec le tissu ganglionnaire et avec le sang de la leucémie lymphogène, n'apportent que des résultats négatifs. Les constatations expérimentales de Muller et Jochmann font attribuer l'action digestive du ferment protéolytique aux éléments de la série myéloïde, et si le sang normal ne possède pas de pouvoir de liquéfaction vis-à-vis des plaques de Lœffler, c'est parce que, normalement, les polynucléaires y sont en nombre insuffisant pour manifester leur présence. Cependant Berestnew signale la liquéfaction de la gélatine, non seulement dans la leucemie myéloïde, mais même dans un cas de leucocytose considérable (40.000 globules blancs) Muller et Jochmann étudient également le pus de diverses suppurations ; ils insistent sur la richesse en ferment protéolytique de toutes les collections purulentes, et ils attirent l'attention sur l'absence du ferment dans les abcès tuberculeux. Enfin dans un

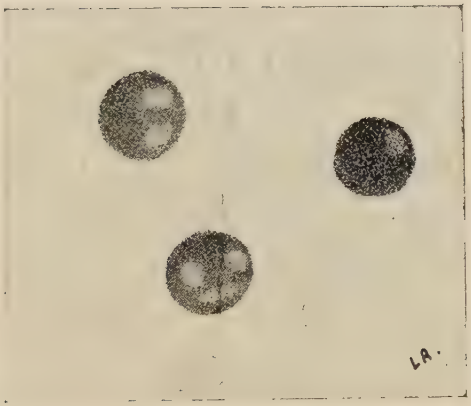

Fig. 4

Réaction à la benzidine (oxydante indirecte) des polynucléaires du sang suivie d'une faible teinture à la safranine.

travail ultérieur, les deux savants allemands démontrent l'action antifermentative du sérum sanguin normal et l'influence exercée par les milieux sur la protéolyse. Les milieux neutres ou faiblement alcalins leur paraissent les plus favorables. Tous ces caractères font rapprocher le ferment protéolytique du ferment tryptique. Comme lui, la protéase digère l'albumine, et, en désagrégant la molécule protéique, la transforme en albumose et en peptone, et pousse ce processus jusqu'à la production des acides aminés. La protéase est un ferment qui ne se trouve pas dans les polynucléaires de tous les animaux. Les leucocytes du sang de l'homme sont riches en protéase tandis que les cobayes et les lapins n'en ont point.

D'après Müller et Jochmann les travaux sur la protéase des polynucléaires et sur l'anti-ferment protéolytique se sont multipliés dans des proportions considérables Stern et Eppenstein confirment les faits rapportés dans les travaux cités précédemment. Ils apportent également une technique personnelle différente de celle qui a été employée par Müller et Jochmann. La différence essentielle de ce procédé nouveau consiste dans la réalisation de la digestion peptique à la température de 37° Eppenstein se propose d'étudier si les maladies accompagnées d'une forte destruction leucocytaire possèdent des modifications de leur anti-ferment protéolytique et il arrive à conclure que les modifications de cet antiferment ne sont pas sensibles.

En même temps que Müller et Jochmann publiaient

leurs premières recherches les ferments leucocytaires étaient en France l'objet de nombreuses recherches de Noël Fiessinger qui, en collaboration avec Pierre-Louis Marie, a fait connaître à ce sujet une série de travaux intéressants.

Les auteurs confirment les constatations de Müller et Jochmann, ils emploient une technique plus simple et plus démonstrative. Ils constatent que les polynucléaires du sang normal possèdent un pouvoir digestif vis-à-vis des albumines mais, pour rendre ce pouvoir évident, les polynucléaires doivent être isolés des globules rouges. Ils isolent ces ferments protéolytiques, en précisent l'action chimique, les découvrent dans les myélocytes non granuleux de la leucémies aiguë, demontrent leur résistance aux antiseptiques, leur degré de résistance à la température, etc. Enfin les auteurs étudient les propriétés des protéases dans la physiologie et la pathologie ; ils l'appliquent au diagnostic clinique et tirent de cette étude des déductions utiles pour la thérapeutique.

II. **Propriétés de la protéase**. — Dans l'étude des propriétés des ferments protéolytiques, les polynucléaires des suppurations aigues offrent le terrain le plus favorable à l'expérimentation. Le ferment protéolytique des éléments myéloïdes manifeste son action digestive à l'égard des albumines à la température optima entre 37° et 55°. Il liquéfie la gélatine, la fibrine crue, le sérum coagulé, les hématies, digère la caséine du lait cuit et la peptone de Witte. Sous l'influence du fer-

ment, l'albumine est transformée successivement en albumoses, en peptones et poussée jusqu'à la phase ultime traduite par la formation des acides aminés. Donc, c'est une digestion complète qu'il effectue, mais, pour obtenir le maximum d'effet, il faut un milieu légèrement alcalin favorisant l'action du ferment. L'acide acétique gêne beaucoup l'action digestive de la protéase, mais, pour la supprimer entièrement, il faut employer des quantités relativement considérables de cet acide. La température élevée détruit l'activité du ferment, ainsi le chauffage à 75° le supprime en un quart d'heure. L'influence des substances chimiques est intéressante à étudier. Müller et Kolaczek apportent à ce sujet quelques détails qui méritent d'être signalés. Ils constatent que la protéase résiste à l'acide phénique, à l'acide picrique, à l'acide acétique à 10 o/o, au formol pur mélangé à parties égales avec le ferment ; elle résiste également à l'acétone, à des dilutions fortes d'alcool amylique. Cette résistance, toute particulière à l'égard des substances antiseptiques, est curieuse à mentionner. Noël Fiessinger et Pierre-Louis Marie ont démontré qu'un exsudat de méningite cérébro-spinale ayant séjourné dans le formol à 10 o/o pendant un mois n'a pas perdu son pouvoir digestif malgré l'influence du liquide conservateur.

Le chloroforme possède la propriété d'activer le pouvoir fermentatif. Cette propriété a été constatée en 1895 par Berestnew et confirmée en 1903 par Delezenne et Pozerski et plus tard par Eppenstein.

Mais, si le ferment protéolytique reste plus ou moins indifférent à l'action des divers réactifs chimiques, il se montre quelquefois d'une sensibilité toute particulière à l'égard de certaines substances organiques comme par exemple le sérum sanguin, le liquide d'ascite, d'hydrocèle et de la pleurésie séro-fibrineuse. Au contact de ces liquides, les effets digestifs du ferment protéolytique des leucocytes sont supprimés très rapidement. Actuellement, grâce à des recherches importantes d'Oswald Schwartz, Muller et Kolaczek, Kolaczek, Kantorowicz en Allemagne, de Noël Fiessinger, de Léo Ambard et de Poggenpohl en France, nous possédons la clef de ce problème. Il est expliqué par la présence d'un anti-ferment protéolytique dans le sérum et dans les liquides épanchés.

Le ferment protéolytique n'est pas spécifique car il exerce son action sur tous les tissus. Un fragment de parenchyme pulmonaire est digéré aussi bien et aussi complètement qu'un morceau de foie plongé dans un pus à polynucléaires.

Toutes ces propriétés font rapprocher le ferment protéolytique des ferments tryptique et peptique. La trypsine surtout présente avec la protéase une analogie remarquable. Elle agit sur les albumines, de la même façon que le ferment leucocytaire en poussant la transformation digestive jusqu'à la formation des acides aminés ; elle exige également un milieu faiblement alcalin. Enfin la communauté des caractères va jusqu'à l'action modératrice exercée par le même anti-ferment. Tout cela semble indiquer que les deux ferments sont identiques au

point de vue de leurs caractères et de leurs propriétés : leur origine seule diffère.

Le ferment peptique diffère du ferment protéolytique des leucocytes par le milieu acide qui lui est indispensable pour manifester son activité. Le travail hydrolysant de la pepsine ne va pas jusqu'à la production des acides aminés libres. Enfin le ferment antipeptique n'est pas pareil à l'antitripsyne et à l'antiprotéoferment. Il ne se détruit pas à la température de 60° comme le font les deux ferments dont nous avons parlé plus haut. Il se décompose en deux éléments : l'un, empêchant la digestion de l'albumine du sérum, est détruit entre 80°-85° ; l'autre, entravant la digestion de l'albumine d'œuf coagulé, est beaucoup plus résistant à l'action des températures élevées. Il peut manifester son action même au-dessus de la température à 100°.

Opie et Bertha Barker, dans le *Journal of. exper Medicine*, en 1907, tentent de démontrer l'existence d'une « lymphoprotéase » dans les suppurations tuberculeuses. Ce ferment possèderait des propriétés analogues à celles qu'on attribue à la protéase. Noël Fiessinger et Pierre-Louis Marie critiquent fortement les recherches d'Opie et Barker et repoussent formellement l'existence de la lymphoprotéase. Ils estiment que la technique employée par les auteurs américains n'est pas à l'abri de causes d'erreurs, car les tissus tuberculeux peuvent contenir des globules blancs du sang, des macrophages et du tissu conjonctif capables de manifester une action protéolytique.

Aujourd'hui, d'une manière définitive, on peut conclure que le ferment protéolytique constitue l'apanage des éléments de la série myéloïde. Probablement les polynucléaires neutrophiles occupent la première place dans l'élaboration des ferments. Les travaux relativement récents de Nattan-Larrier et Parvu, d'Achard, Ramond et Foix, de Rist et Kindberg apportent des preuves suffisantes pour démontrer que les éosinophiles possèdent le même pouvoir. Enfin les leucocytes anormaux appartenaent à la série myéloïde que la pathologie nous a fait connaître, sont doués, eux également, des mêmes propriétés. Muller et Jochmann attribuent l'action protéolysante aux myélocites granuleux. Noël Fiessinger et Pierre-Louis Marie démontrent dans un cas de leucémie aiguë avec 90 o/o des myélocytes non granuleux une action digestive protéolytique particulièrement prononcée pour ces éléments anormaux.

III. **Technique**. — Les premières recherches concernant le ferment protéolytique ont été faites à l'aide de procédés chimiques complexes et d'une interprétation difficile. Muller et Jochmann ont eu le mérite d'introduire une technique plus simple, que nous avons mentionnée au passage dans le chapitre précédent.

Nous résumons ici la technique dont se sont servis Noël Fiessinger et Pierre-Louis Marie ; pour tous les détails nous indiquons les travaux de ces deux auteurs et particulièrement l'article paru dans le *Journal de*

Physiologie et de Pathologie en juillet 1909 et dans leur livre sur les « *Ferments digestifs des leucocytes* ».

D'abord les auteurs procèdent à l'isolement des leucocytes et ensuite à la mise en évidence de leur ferment.

1° Isolement des leucocytes. — Pour constater les effets de la protéase il est indispensable de se servir d'émulsions leucocytaires concentrées, ensuite il faut éviter la coexistence du sérum sanguin ou des liquides d'exsudats, car ces liquides peuvent exercer par la présence d'antiferment une action entravante pour la protéase.

a) *Dans le sang.* — Les leucocytes du sang doivent être isolés des globules rouges par les procédés habituels. On recueille le sang dans une solution oxalatée. La séparation des globules blancs s'opère par plusieurs centrifugations suivies de décantage. Finalement les globules blancs sont recueillis à la pipette. Il est impossible d'obtenir une séparation absolue des hématies, mais leur nombre insuffisant empêche très peu l'action du ferment. Dans les cas de leucémie myélogène il n'est pas nécessaire de procéder à toutes ces manipulations car l'action du ferment protéolytique y est suffisamment accentuée.

b) *Dans les exsudats.* — Centrifuger le liquide d'exsudation avant toute coagulation, recueillir le culot à l'aide d'une pipette fine, le diluer dans du sérum chloruré-sodique et l'employer tel que.

c) *Dans le pus.* — Utiliser le pus soit à l'état pur, soit dilué dans du sérum physiologique.

2° Recherche des ferments. — a) *Préparation des milieux.* — Pour étudier les protéases, on peut utiliser plusieurs milieux, mais leur valeur pratique est différente. Ainsi, la gélatine est à rejeter à cause de sa liquéfaction trop facile sous l'influence des germes microbiens. L'emploi de l'ovalbumine liquide entraîne des difficultés considérables pour l'appréciation des résultats. Le sérum de bœuf coagulé, préconisé par Müller et Jochmann, est un très bon milieu, mais on peut lui reprocher l'humidité de sa surface qui permet une diffusion légère de l'émulsion leucocytaire. Ensuite le sérum coagulé peut contenir de l'anti-ferment dont la présence entraînerait une gêne à l'action de la protéase.

Noël Fiessinger et Pierre-Louis Marie introduisent dans leur technique l'emploi des plaques d'ovalbumine coagulée et préparée dans des boîtes de Petri ou dans des tubes inclinés suivant les procédés habituels. C'est un excellent milieu de digestion peptique présentant une surface lisse et suffisamment sèche pour faciliter des ensemencements limités. Les plaques ainsi préparées sont portées dans un thermostat réglé à 53°-55° ou dans les étuves à plan incliné de Koch et abandonnées dans ces conditions de 24 à 48 heures. L'étuve de Koch présente le réel avantage d'être vaste d'abord et de faciliter à travers la vitre la surveillance des modifications qui peuvent se produirent.

b) *Manifestation de l'action du ferment.* — Après un séjour assez prolongé dans l'étuve l'action du ferment protéolytique se manifeste par la formation de capsules

très caractéristiques là où a été déposée l'émulsion leucocytaire. L'influence digestive du ferment semble évidente ; cependant, on peut se demander si ce n'est pas plustôt un effet d'autolyse si riche en manifestations de toutes sortes, et qui ne serait alors qu'une conséquence de la cadavérisation leucocytaire. Les recherches de Noël Fiessinger et de Pierre-Louis Marie ont apporté sur ce sujet des lumières nouvelles. Ces auteurs démontrent que « in vitro » l'autolyse peut activer et augmenter l'action du ferment protéolytique, mais qu'elle ne peut, seule, créer le pouvoir digestif des leucocytes et que l'existence de la protéase est antérieure à l'autolyse. La phagocytose et la macrophagie, qui sont des manifestations de la digestion figurée, font entrevoir l'existence du ferment *in vivo*. Enfin, en plaçant les milieux albumineux ensemencés de l'émulsion leucocytaire à la température de 50°-55°, on opère dans des conditions défavorables à l'action de l'autolyse dont la température optima oscille entre 38° et 40°. Mais si le ferment protéolytique n'est pas créé par l'autolyse il subit néanmoins une influence considérable. Le pus qui a subi l'action de l'autolyse paraît nettement plus actif, de même que la présence du ferment protéolytique joue un rôle important dans l'autolyse. En présence de ce ferment, Jochmann signale une apparition rapide de la leucine, de la tyrosine, de la xanthine, de l'hypoxanthine, de la guanine et de l'ammoniaque. Pfeiffer remarque que l'autolyse est plus rapide dans le sang de leucémie myélogène et dans la leucocytose que dans le sang

normal. Schumm fait des constatations analogues à propos du sang et des rates des leucémiques.

IV. **Technique de la dialyse appliquée à l'étude des protéases leucocytaires.** — A l'étude de la protéase leucocytaire nous avons appliqué récemment avec Noël Fiessinger la technique de la dialyse, et nous apportons ici toutes ces constatations de notre expérimentation.

1° Technique. — La technique que nous avons employée est celle d'Abderhalden. Nous n'entrerons pas dans tous les détails de la méthode employée et nous n'insisterons pas sur les multiples discussions que la découverte des ferments à soulevées dans la littérature médicale du monde entier. Pour toutes questions nous renvoyons le lecteur à des travaux nombreux et intéressants qui ne traitent que de cette question exclusivement. Tous les auteurs insistent sur la description de leur technique ; dans une thèse récente de Mme Dejuste-Defiol nous trouvons également une description précise et minutieuse. Aussi, nous nous bornons uniquement à signaler les côtés particuliers à l'adaptation de la dialyse à l'étude de la protéase.

Le matériel dont nous nous sommes servis est celui qu'on emploie habituellement dans tous les laboratoires où la technique d'Abderhalden est d'usage courant:

1° les tubes de dialyse, perméables aux peptones et

aux produits de la décomposition de l'albumine, mais imperméables à l'albumine même.

2° La verrerie soigneusement stérilisée.

3° Les antigènes, préparés avec les tissus humains débarrassés de toute trace de sang et d'acides aminés.

4° Une solution de l'albumine d'œuf, fraîchement préparée.

5° La solution à 1 o/o de ninhydrine (hydrate de tricéto hydridène).

6° Le complément, sérum de cobaye ou serum de malade recueilli aseptiquement.

Le pus (1) a été recueilli au moment de l'incision, autant que possible sans la présence de sang. Pour obtenir des émulsions leucocytaires très pures, nous procéderons à des lavages au sérum chloruré sodique à 8 o/o. Le sérum qui a servi au lavage est séparé des leucocytes par la centrifugation et le décantage successifs. Après une dizaine de lavages, le pus ne contient ni sang ni acides aminés. La présence de ces produits de décomposition protéique peut être révélée par la ninhydrine. Si le liquide de lavage donne avec le réactif une coloration violette, on recommence encore les mêmes manipulations. Nous signalons à cette occasion que quelquefois il est impossible de se débarrasser complètement des acides aminés et on est forcé d'employer le

(1). Nous devons ce pus à l'obligeance de M. le Docteur Bazy, chirurgien des Hôpitaux, et nous lui adressons ici nos plus vifs remerciements.

pus avec des traces de ces produits de déchet.

Comme antigènes nous avons utilisé le placenta, le rein, le foie et le sang, très minutieusement préparés. On les conservait au frais dans de petits récipients entre du chloroforme et du toluol. Avant chaque expérience les antigènes ont été éprouvés à la ninhydrine.

Notre expérimentation repose sur ce fait que : les polynucléaires contiennent une protéase capable de digérer les albumines étrangères et même ses propres albumines en les hydratant et les dédoublant en corps dialysables, c'est-à-dire possédant des molécules suffisamment petites pour passer à travers la membrane d'un dialyseur.

Nous avons examiné à ce sujet plusieurs variétés de pus chaud et nous spécifierons leur origine au fur et à mesure que nous résumerons chacune de nos expériences qui portent sur six cas différents. Tous ces pus examinés cytologiquement contenaient des polynucléaires en grande quantité. Les polynucléaires soigneusement lavés ont été dilués dans du sérum physiologique à 8 o/oo. Nous nous sommes servis ensuite de ces émulsions leucocytaires à des dilutions variables. Nous avons éprouvé l'influence que pouvait exercer sur la digestion leucocytaire la concentration de la solution employée, les températures diverses, l'ébulition et l'autolyse.

De grandes précautions sont nécessaires dans l'application de cette technique à l'étude des protéases et nous ne saurions trop insister car par elle-même déjà la

méthode d'Abderhalden exige des soins délicats et une exécution des plus minutieuses.

Une goutte de pus qui serait tombée en dehors du dialyseur dans l'eau qui l'entoure donnerait forcément une coloration violette à l'épreuve de la ninhydrine. l'emploi des antigènes exige également une attention continuelle, et il est nécessaire d'accompagner chaque expérience d'une série de témoins qui doivent être, eux aussi, vérifiés attentivement.

Nous avons scrupuleusement exécuté les principes de la technique sans négliger aucun des détails recommandés.

Nous résumons donc ici les résultats de nos examens en une série de tableaux faits pour chaque cas séparément.

2° Résumé des expériences

A. *Examen du pus provenant d'un furoncle.* — Pus recueilli depuis 24 heures.

Examen cytologique : polynucléaires streptocoques. Après 2 lavages au sérum, l'épreuve à la ninhydrine reste négative. Le pus est dilué de 100 volumes de sérum chloruré sodique et la moitié de la dilution est mise à l'étuve à 60° pendant une demi-heure. Complément sérum de cobaye.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	REMARQUES
Pus à 1/100	+	+	+	+	+	.	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	
Sérum chloruré sodique	..	..	..	..	..	+	+	+	+	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	
Eaux albumineuse à 1 o/o	..	+	..	..	..	+	..	..	..	..	+	..	..	..	..	+	..	..	..	
Placenta	..	..	+	..	..	..	+	..	..	..	..	+	..	..	..	..	+	..	..	
Rein	..	..	..	+	..	..	..	+	..	..	..	..	+	..	..	..	..	+	..	
Foie	..	..	..	..	+	..	..	..	+	..	..	..	..	+	..	..	..	..	+	
Pus chauffé à 60° pendant 30 minutes	..	..	..	..	..	..	..	..	..	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Complément	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	+	+	+	+	+	
Résultats	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

B. — Examen du pus d'un abcès du sein ouvert spontanément, recueilli et examiné immédiatement après l'ouverture.
Examen cytologique : polynucléaires très altérés, nombreuses chaînettes de streptocoques.

13 lavages au sérum chloruré sodique à 4 o/oo. L'eau du dernier lavage contient des acides aminés en petite quantité. Le pus est employé incomplètement lavé.

Le pus est dilué à 1 p. 10, une partie de cette dilution est chauffée pendant 30' à 60°.

Complément sérum du cobaye.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
Pus dilué à 1 p. 10.	+	+	+	+	+	+	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	....	....	....	....	....
Sérum physiolog...	....	..	..	..	....	..	+	+	+	+	+	+	..	..	..	..	..	..	..	..	....	....	....	....	....
Eau albumin. à 1 °/°	....	+	..	..	....	..	..	+	..	..	..	..	..	+	..	..	..	..	..	+	....	....	....	....	....
Placenta.....	....	..	+	..	....	..	..	..	+	..	..	..	..	..	+	..	..	..	..	..	+	....	....	....	....
Rein.....	....	..	..	+	....	..	..	..	..	+	..	..	..	..	..	+	..	..	..	..	....	+	....	....	....
Hématies bouillies.	....	..	..	..	+	..	..	..	..	..	+	..	..	..	..	..	+	..	..	..	....	....	+	....	....
Sérum normal.....	....	..	..	..	....	+	..	..	..	..	..	+	..	..	..	..	..	+	..	..	....	....	....	+	....
Pus chauffé à 60° pendant 30'.....	....	..	..	..	....	..	..	..	..	..	..	..	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Complément.....	....	..	..	..	....	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	+	+	+	+	+	+	+
Résultats.....	++	0	+	0	++	0	0	0	0	0	0	0	0	+	+	+	+	+	0	+	++	++	++	++

Ne pas tenir compte du résultat du tube 18.
Une goutte de pus chauffé est tombée en dehors du dialys. Remarques

C. *Pus du même abcès du sein recueilli au pansement.* — Très multiples lavages au sérum à 8 o/oo. L'eau du dernier lavage filtrée deux fois ne donne aucune coloration à l'ébullition avec la ninhydrine.

Chauffage de pus à 60° pendant une heure.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	Remarques
Pus dilué à 1/50. . .	+	+	+	+	+	+	..	..	..	..	..	pus autolysé pendant 3 jours, seul	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	Les dialyseurs 21, 22, 23 et 24 contenaient le pus datant depuis 3 jours. Ce pus était incomplètement débarrassé des acides aminés et à concentration plus forte à 1/20.
Sér. chloruré-sod. .	..	..	..	..	..	..	+	+	+	+	+		..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	
Eau album. à 1 o/o.	..	+	..	..	..	..	+	..	..	..	..		..	+	..	..	..	..	..	+	..	..	..	..	
Placenta.	..	..	+	..	..	..	..	+	..	..	..		..	..	+	..	..	..	..	..	+	..	..	..	
Rein.	..	..	..	+	..	..	..	..	+	..	..		..	..	..	+	..	..	..	..	..	+	..	..	
Hématies bouillies. .	..	..	..	..	+	..	..	..	..	+	..		..	..	..	..	+	..	..	..	..	..	+	..	
Sérum de l'homme. .	..	..	..	..	..	+	..	..	..	..	+		..	..	..	..	..	+	..	..	..	..	..	+	
Pus chauffé à 60° pendant une heure	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Complément.	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..		..	..	..	..	..	..	+	+	+	+	+	+	
Résultats. . . .	0	0	0	0	0	+	0	0	0	0	0	+	0	0	0	0	0	+	0	0	+	+	+	+	

E. *Expérience sur le rapport existant entre la réaction et le taux de la concentration de l'émulsion.* — Pus d'un abcès du sein incisé.

Examen cytologique : Polynucléaires relativement peu altérés, quelques rares streptocoques.

Le lavage est parfait, une partie de pus est chauffée pendant une heure à la température de 60°.

Les dilutions sont les suivantes 1/10, 1/50 et sérum physiologique à peine louche à cause de la présence des leucocytes.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Pus concentré à 1/10	+	+	+	+	..	..	..	..	..	..	....	..	....	..	..	..	..	..	..	..
Pus dilué à 1/50	....	..	..	..	+	+	+	..	..	..	....	..	....	..	..	..	..	..	..	..
Pus très dilué	....	..	..	..	..	..	..	+	+	+	....	..	....	..	..	..	..	..	..	..
— à 1 p. 10 chauffé	....	..	..	..	..	..	..	..	..	..	+	+	+	..	..	..	..	..	..	..
— à 1 p. 50 »	....	..	..	..	..	..	..	..	..	..	....	..	....	+	+	+	..	..	..	..
— bouilli	....	..	..	..	..	..	..	..	..	..	....	..	....	..	..	..	+	+	..	..
— autolysé	....	..	..	..	..	..	..	..	..	..	....	..	....	..	..	..	..	..	+	..
— — bouilli	....	..	..	..	..	..	..	..	..	..	....	..	....	..	..	..	..	..	..	+
Eau albumineuse	....	+	..	..	..	..	..	..	..	..	....	..	+	+	..	..	..	..	..	..
Placenta	....	..	+	..	..	+	..	..	+	..	....	+	....	..	+	.	..	..	..	..
Sérum du malade	....	..	..	+	..	..	+	..	..	+	....	..	....	..	..	+	..	+	..	..
	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Résultats	++	0	0	0	0	0	0	0	+	+	++	0	++	0	0	0	+	+	+	0

D. *Pus d'abcès du sein recueilli au moment de l'incision.* — Le pus contient du sang en quantité notable.
Examen cytologique : les polynucléaires sont très altérés, parfois surchargés de vacuoles graisseuses. Streptocoques.
Le lavage n'est pas complet, il reste dans l'eau de lavage des traces d'acides aminés.
Chauffage à 65° pendant 40 minutes.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	Remarques
Pus dilué à 1 p. 10	+	+	+	+	+	+	..	..	..	..	..	Pus bouilli	..	..	..	..	..	..	..	....	....	....	....	.. ..	= réaction faiblement positive dans les nos 14 et 16.
Sérum physiolog.	..	..	..	..	..	..	+	+	+	+	+		..	..	..	..	..	..	..	....	....	....	....	....	
Eau album. à 1 %	..	+	..	..	..	..	+	..	..	..	..		..	+	..	..	..	..	..	+	....	....	....	....	
Placenta	..	..	+	..	..	..	..	+	..	..	..		..	..	+	..	..	..	..	....	+	....	....	....	
Sein	..	..	..	+	..	..	..	..	+	..	..		..	..	..	+	..	..	..	....	....	+	....	....	
Hématies bouill.	..	..	..	..	+	..	..	..	..	+	..		..	..	..	..	+	..	..	....	....	....	+	....	
Sérum du malade	..	..	..	..	.	+	..	..	..	..	+		..	..	..	..	..	+	..	....	....	....	.. ..	+	
Pus chauffé à 65° pendant 40'	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Complément	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..		..	..	..	..	..	..	+	+	+	+	+	+	
Résultats ...	+	+	+	+	+	+	0	0	0	0	0	0	+	+	+	+	+	+	+	++	++	++	++	++	

F. *Pus provenant d'une pleurésie purulente.*

Formule cytologique n'offre rien de particulier.

Dilution 1/10 et 1/50.

Chauffage à 60° pendant une heure.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	Remarques
Eau albumineuse	..	+	..	..	..	..	+	..	..	..	....	....	....	..	..	..	..	....	..	
Placenta	..	..	+	..	..	..	..	+	..	..	....	+	....	..	+	..	..	....	..	
Hématies bouillies	..	..	..	+	..	..	..	..	+	..	....	....	....	..	..	..	..	....	..	
Sérum du malade	..	..	..	..	+	..	..	..	..	+	....	....	+	..	..	..	..	+	+	
Pus à 1 p. 10	+	+	+	+	+	..	..	..	..	..	....	....	....	..	..	..	..	....	..	
— à 1 p. 50	..	..	..	..	..	+	+	+	+	+	....	....	....	..	..	..	..	....	..	
— à 1 p. 10, chauffage 50°	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	+	+	+	..	..	..	..	....	..	
— à 1 p. 50 »	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	....	....	....	+	+	+	..	....	..	
— bouilli	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	....	....	....	..	..	..	+	+	..	
	—	—	—	—	-	—	—	—	-	—	— -	——	——	—	—	—	—	— —	—	
Résultats	+	0	+	+	+	0	0	+	+	0	+ +	+ +	+ +	0	0	+	+	+ +	0	

Conclusions. — En examinant les résultats de nos recherches nous constatons que la décomposition de l'albumine par la protéase se produit dans les cônes de dialyse et qu'elle ne nécessite aucunement la présence d'une albumine étrangère. Ainsi, dans les expériences nos 2, 4, 5 et 6, le pus seul à des dilutions fortes, a laissé passer à travers la membrane du dialyseur des acides aminés en quantité notable. L'autolyse du pus semble activer encore le processus car, dans ces conditions, la réaction à la ninhydrine semble plus intense. Les albumines hétérogènes ne semblent pas influencer la digestion qui se produit et la protéase ne paraît nullement spécifique. Les antigènes que nous avons employés se comportent de la même manière sauf cependant l'albumine de l'œuf.

L'action de l'ovalbumine mérite de nous arrêter un instant. Il est curieux de remarquer parfois son influence entravante sur la digestion protéique. Le fait s'est reproduit plusieurs fois : nous l'avons constaté dans l'expérience n° 2, nous l'avons retrouvé encore dans les expériences 5 et 6. Nous pouvons rapprocher ce fait à des constatations faites par M. Pierre-Louis Marie dans sa thèse au sujet de la pepsine. Il peut être expliqué par une sorte d'adsorption qui se serait produite. Mais ce résultat est loin d'être constant comme nous pouvons le voir d'après les expériences que nous avons faites. D'autre part, les dosages d'acides aminés à l'aide de la méthode au formol que nous avons pratiqués nous démontrent que l'action des solutions d'albumine n'est

qu'apparente, en réalité les solutions d'albumine paraissent surtout entraver la dialyse. Le sérum humain normal ne semble point exercer d'action manifestement contraire. L'action antifermentative pour les protéases du sérum humain, si nette quand on se sert de la technique de Noël Fiessinger et de Pierre-Louis Marie, s'efface ici et devient infidèle et inconstante à tel point que nous ne pouvons formuler aucune opinion ferme. Dans quelques cas, l'albumine étrangère des tissus humains semble exercer une action également empêchante. Il est bien entendu aussi que, dans ces résultats, il faut tenir compte des imperfections de la méthode dialysante, dont les résultats sont troublés par multiples facteurs et par de nombreuses causes d'erreurs. On ne peut tenir compte que des faits fortement positifs qui, incontestablement, signifient une désintégration intense de la molécule albuminoïde.

Il n'est pas indifférent de soumettre à la dialyse des émulsions leucocytaires concentrées ou très diluées. La réaction de la ninhydrine est vive et bien caractéristique, seulement lorsqu'on emploie les leucocytes en quantité relativement grande.

Les solutions diluées au 1/50 ou au 1/100 se comportent tout autrement. Dans ces conditions les résultats deviennent incertains et variables, et même, si la réaction se produit, elle est faible et prête à des hésitations.

Le chauffage à 65 diminue légèrement l'intensité de la réaction sans la supprimer entièrement. L'action des températures plus élevées (90° et 100°) pendant 40 à

60 minutes n'est pas constante ; parfois, à la suite de chauffage prolongé, la réaction est supprimée mais non d'une manière absolue. Il est possible qu'une certaine quantité d'acides aminés, restés malgré le lavage à l'état de dissolution dans l'émulsion leucocytaire, filtrent à travers la membrane du dialyseur et vient manifester sa présence au contact de la ninhydrine.

Néanmoins l'action empêchante des températures élevées la plupart du temps est notable. L'addition d'une petite quantité de sérum de cobaye peut lui rendre un peu de son intensité primitive. Il est à remarquer seulement que le sérum de cobaye dont nous nous sommes servis comme de complément, ne joue certainement pas le rôle important qu'il exerce habituellement dans la réaction de fixation.

En somme, la méthode de la dialyse appliquée à l'étude des protéases ne présente aucun avantage sur la technique de la digestion protéique exercée, sur les plaques de l'albumine de l'œuf coagulé.

Il résulte néanmoins de nos recherches que les « ferments de défense » d'Abderhalden et la protéase leucocytaire constituent deux ferments absolument indépendants. Les caractères de spécificité et de thermolabilité et de réactivation possible les font différencier des protéases non spécifiques. Cette opinion va à l'encontre de la première hypothèse d'Abderhalden qui classait les « Schutzferment », dans la catégorie des protéases d'origine leucocytaire. Il est possible, tout de même, qu'une certaine quantité de la protéase leucocytaire non spécifique

diffusée dans le sérum, puisse se confondre avec les « ferments de défense », masquer ses caractères de spécificité et constituer ainsi une cause d'erreur qui permettrait même parfois de douter du caractère principal des schutzferments.

Erich Franck et Felix Rosenthal de Breslau étudient les rapports qui existent entre les ferments d'Abderhalden et les immunisines, et ils démontrent que les immunisines et les ferments d'Abderhalden ont quelques rapports d'origine mais il n'y a pas d'identité entre eux et en somme il existe entre eux des différences assez profondes. Dans l'organisme les immunisines persistent bien plus longtemps que dans les quelques mois de grossesse, par exemple, pendant lesquels la présence des ferments de défense se manifeste nettement. Les immunisines se conservent *in vitro* bien plus longtemps que les ferments de défense et elles sont actives même lorsque le serum est dilué, enfin pour se former dans l'organisme les immunisines exigent un certain temps, tandis que les ferments d'Abderhalden apparaissent très rapidement.

Steisig de Lemberg suppose que les ferments de défense appartiennent à la classe des bactério-cytoprotéolysines et qu'ils possèdent comme eux les caractères des ambocepteurs. Pour lui, le ferment doit se composer de deux parties : une spécifique thermostabile, l'autre non spécifique, thermolabile. L'expérimentation conduite par cet auteur a démontré que l'addition de complément au sérum de femme enceinte, inactivé par le

chauffage pendant une heure au bain-marie à 58° rend au sérum toute son activité et la réaction redevient positive.

Tout dernièrement André Léri a étudié la séro réaction à la fibrine dans le diagnostic de l'hémorragie. Il constate dans quatre cas accompagnés d'une destruction intense de globules blancs (ostéomyélite suppurée, pleurésie purulente à anaérobies, une salpingite suppurée et une leucémie myélogène) que la réaction à la fibrine est positive. La réaction au cerveau du sérum des mêmes malades l'est également, ce qui résulte en somme de l'action de la protéase leucocytaire qui n'est pas spécifique.

Léri suppose que les ferments anti-fibrine et anti-sérine, ne sont pas spécifiques, il est possible même qu'ils se rapprochent des protéases : en tout cas ils ne sont pas « étroitement spécifiques ».

V. **Recherches des acides aminés dans le pus par la technique chimique.** — Les résultats variables que nous avons obtenus au cours de notre expérimentation nous ont fait employer la méthode chimique comme moyen de contrôle.

Technique.— Pour les dosages d'acides aminés nous nous sommes servis de la technique de Sorensen-Ronchèse, modifiée par Bournigault, décrite et employée par Bith à propos de l'étude de l'amino-acidurie. Voici les détails de ce procédé adopté à la recherche des acides aminés — dans le pus.

Préparer une solution de pus dépourvu de globules rouges en le diluant dans son volume de sérum chloruré sodique à 7 o/oo. Prendre 20 cc, ajouter 10 centimètres cubes d'une solution d'hydrate de magnésie au 1/20e et quelques gouttes de phénol-phtaléine et ensuite 10 cc d'une solution au 1/10e de phosphate de chaux. Ajouter de l'eau jusqu'à 60 cc. Laisser reposer le mélange de 2 à 3 heures. Filtrer et prendre 30 cc. La solution est fortement alcaline, on enlève l'excès de l'alcalinité avec une solution de $SO^4 H^2$ jusqu'à faible coloration rose. Puis ajouter 5 cc. de formol neutralisé. Lorsque le pus ne contient point d'ammoniaque, on peut se passer de toutes les manipulations précédentes, sauf la neutralisaiion. Dans ce cas, ajouter directement dans la solution neutre un formol neutralisé.

La solution devient encore acide. Doser cette nouvelle acidité avec une solution de soude décinormale. Le chiffre obtenu indique la quantité des acides aminés contenus dans 10 c. cubes de pus. Pour calculer l'azote aminé pour 1000 cc., appliquer la formule suivante :

$$A = \frac{n}{10} \times 0{,}0014 \times 1000.$$

Nous rapportons ici les chiffres provenant de deux examens qui nous serviront d'exemples.

Première expérience. — Le pus employé provient d'une empyème à pneumocoques. L'examen cytologique démontre qu'il s'agit d'un pus à polynucléaires indemnes, avec très peu d'éléments microbiens.

Le pus est dilué à moitié dans le sérum physiologique et conservé dans des flacons hermétiquement fermés sous une couche de toluol.

1er	dosage		0,14 d'azote formol
2e	—	après 24 heures	0,182 —
3e	—	après 48 heures	0,222 —
4e	—	après 72 heures	0,28 —
5e	—	après 144 heures	0,176 —

Deuxième expérience. — Le pus provient d'une pleurésie interlobaire à pneumocoques. A l'examen cytologique, on trouve des polynucléaires en grande quantité avec des altérations cellulaires minimes.

Le pus est dilué dans du sérum chloruré, sodique dans les proportions suivantes : un volume de pus pour trois volumes de sérum.

La dilution est répartie dans quatre ballons :

Dans le 1er ballon, pus dilué dans du sérum.
» 2e » » chauffé à 80° pendant 30 min.
» 3e » » » 100e
» 4e » » dilué + 5 cc. de blanc d'œuf.

1er	dosage pur non chauffé		0,09 d'azote-formol
2e	» »	après 24 h.	0,16 »
3e	» pus chauffé à 80°	»	0,102 »
4e	» » 100°	»	0,04 »
5e	» »	» 48 heur.	0,05 »
6e	» pus n. ch. + ovalbumine	après 24 h.	0,152 »
7e	» »	» 48 h.	0,210 »

Conclusions. — Nous pouvons conclure de notre expérimentation que :

Les polynucléaires en solutions isotoniques contiennent, une protéase qui pousse l'hydratation de ses propres albumines, jusqu'à la production des acides aminés. L'autolyse exerce certainement une action favorisante sur le ferment protéolytique et exagère son action digestive, mais au bout d'un certain temps cette action s'épuise et la quantité des acides aminés diminue.

La présence d'une albumine étrangère n'est nullement nécessaire puisque dans le protoplasma des polynucléaires la protéase trouve suffisamment d'albumine pour exercer son pouvoir. L'albumine d'œuf ne manifeste aucun rôle empêchant sur la digestion et probablement l'action frénatrice pour la protéase que nous avons signalée à propos de la technique de la dialyse, lui est spéciale.

Le chauffage diminue graduellement l'action digestive de la protéase et, même, il est probable qu'une partie des acides aminés est détruite par la température élevée et ne se retrouve plus dans le dosage.

VI. **Application diagnostique.** — Les notions acquises au sujet des ferments protéolytiques des éléments de la série myéloïde trouvent une application pratique dans le diagnostic clinique des leucémies et dans le diagnostic des exudats et transudats.

1° *Dans le diagnostic des variétés de leucémies.* —

En général ce diagnostic ne présente point de difficultés sérieuses grace à l'aspect caractéristique présenté par les éléments leucocytaires. Mais il existe des cas exceptionnellement difficiles, lorsqu'on se trouve en présence d'une leucémie aiguë avec prédominance sensible des cellules primordiales à protoplasma basophile non granuleux. Dans ces conditions, les gros lymphocytes et les myélocytes non granuleux peuvent être confondus, et une leucémie aiguë peut être prise pour une leucémie lymphogène. On se rend bien compte combien la recherche du pouvoir protéolytique peut devenir d'un secours précieux dans l'usage clinique. La digestion de l'albumine par la protéase appartient à la série myéloïde seule. Elle fait entièrement défaut dans la leucémie lymphoïde. Et, si après 48 heures de protéolyse, le ferment de gouttelettes d'émulsion leucocytaire isolé du sang du malade, a creusé des cupules arrondies, aucun doute ne peut exister sur la nature de l'élément en question. A la rigueur on peut se servir encore, pour établir ce diagnostic, de la réaction des oxydases au paraphénylène diamine et α naphtol ou de la benzidine, réactions que nous avons décrites dans le chapitre précédent et sur lequel il est inutile de revenir.

2° *Dans le diagnostic des exsudats et transudats.* — Les différences capitales qui existent entre les polynucléaires et les lymphocytes se manifestent de différentes façons. D'abord la morphologie de ces éléments d'origines différentes fournit des renseignements précis

par le cyto-diagnostic qui ne pourrait être remplacé en aucun cas. Le diagnostic bio-chimique apparaît comme une réaction de contrôle et elle peut également être d'un secours précieux dans les cas où les éléments morphologiques ont subi une désagrégation telle qu'un examen direct ne pourrait donner aucune indication nette et précise. Ce moyen de diagnostic est désigné par le terme *zymo-diagnostic*. Noël Fiessinger et Pierre-Louis Marie s'occupent de la question avec leur précision habituelle. Il résulte de leurs recherches que l'épanchement d'une pleurésie séro fibrineuse, chez des tuberculeux pulmonaires,ne possède aucun pouvoir protéolytique; par contre, la recherche des ferments lipolytiques est presque toujours positive. Dans la pleurésie aiguë et fétide la digestion protéolytique est constante. Les épanchements pleuraux suppurés tuberculeux ne font pas digérer l'albumine, mais ils émulsionnent et acidifient les graisses. La méningite cérébro-spinale à méningocoques et à pneumocoques, ainsi que l'arthrite gonoccique avec épanchement, digèrent l'albumine.

En somme,on peut conclure, avec Noël Fiessinger et Pierre-Louis Marie, que le pouvoir protéolytique constitue une propriété exclusive des exsudats à polynucléaires et manque totalement dans les exsudats riches en lymphocytes. Par contre, ce dernier genre d'épanchement possède une action lipolytique qui fait défaut dans les exsudations à polynucléaires.

Le zymo-diagnostic ne peut remplacer le cytodiagnostic mais il constitue un adjuvant sérieux de l'examen

morphologique et au besoin il peut le remplacer lorsque les altérations cellulaires et la cytolyse rendent les éléments méconnaissables.

Le pus des suppurations aiguës présente un fort pouvoir protéolytique ; par contre, le pus tuberculeux contient très rarement des polynucléaires. J. Laurence a montré dans sa thèse que toutes les suppurations aiguës quels que soient leur siège et le germe infectieux, à l'exclusion du bacille de Koch, possèdent des ferments protéolytiques faciles à découvrir ; d'autre part, toute suppuration tuberculeuse non modifiée par une injection surajoutée ne possède aucun pouvoir protéolytique, mais une poussée d'infection secondaire peut venir modifier les résultats. Jochmann a démontré que les suppurations mycociques, malgré leur grand rapprochement avec les abcès tuberculeux, digèrent l'albumine. J. Laurence insiste sur ce caractère des zymo-diagnostics, et résume les constatations de sa longue expérimentation dans la phrase suivante. « Si une protéolyse négative possède « une grosse valeur et permet de dire abcès dû au bacille « de Koch, une protéolyse positive a une valeur beau- « coup moindre et ne permet pas de conclure à l'ab- « sence du bacille de Koch ».

VII. **Rôle physiologique de la protéase et son application pathologique**. — Les ferments leucocytaires interviennent dans de nombreux processus physiologiques et pathologiques. Ils semblent prendre une part active même dans les principaux actes de la vie. Ainsi au cours de la digestion les leucocytes intervien-

nent d'une manière évidente. De nombreux auteurs ont établi que l'acte de la digestion est suivi de près d'une poussée leucocytaire appelée leucocytose digestive qui parfois élève le nombre des globules blancs jusqu'au chiffre important de 15.000 par millimètre cube. Cette leucocytose se produit surtout aux dépens des polynucléaires. D'autre part il a été démontré par des numérations minutieuses que le taux des polynucléaires est plus élevé chez les animaux carnivores que chez les herbivores. Ces deux faits rapprochés font supposer que la leucocytose digestive se produit dans le but de faciliter l'absorption des albuminoïdes en utilisant le pouvoir protéolytique des leucocytes. Les polynucléaires sont seuls, parmi les leucocytes, capables d'opérer les transformations des albumines en peptones. Pour que ce processus puisse se produire *in vivo* il faut admettre que les matières protéiques sont absorbées par l'épithélium intestinal sans peptonisation. Les expériences d'Arthus prouvent la justesse de cette hypothèse. Castaigne et Chiray observent la digestion des albumines hétérogènes introduites dans l'organisme par injection. Noël Fiessinger et Pierre-Louis Marie étudient l'évolution histologique des résorptions d'albumine en introduisant sous la peau du cobaye des sacs de collodion contenant de l'albumine d'œuf coagulée ou liquide. Dans les deux cas une forte réaction polynucléaire semble intervenir et déterminer la disposition de l'albumine.

Donc, en se basant sur toutes ces expériences, on peut conclure que les protéases des polynucléaires interviennent dans l'acte de la digestion.

On peut se demander également si les protéases ne jouent pas un rôle important dans le fonctionnement glandulaire. L'infiltration leucocytaire, au niveau des muqueuses digestives, peut être invoquée comme argument à l'appui de cette hypothèse. Slovtzoff donne une autre explication à ce phénomène. Il l'attribue à l'action de chimiotaxie positive exercée par l'oxydase de la salive sur les leucocytes.

Les ferments protéolytiques des leucocytes exercent leur action puissante dans les mutations des tissus telles, par exemple, l'utilisation des réserves protéiques de l'organisme comme dans l'amaigrissement ou dans la désintégration musculaire.

Enfin Jochmann démontre que la protéase exerce une action frénatrice sur la coagulation sanguine.

En pathologie, le rôle du ferment protéolytique paraît plus étendu. Les faits acquis par une longue expérimentation jettent des lumières nouvelles sur bien des processus pathologiques, et nous essaierons de donner un aperçu sommaire sur les découvertes les plus récentes et les plus importantes.

Au cours des suppurations aiguës, le rôle du ferment protéolytique se présente avec une évidence démonstrative. Les leucocytes du pus sont des polynucléaires ; au moment de leur mort ils libèrent les ferments contenus dans le protoplasma, et peuvent continuer leur œuvre après la mort du leucocyte. Cette action se traduit d'abord par la liquéfaction du pus et ensuite par la digestion des tissus voisins comme nous l'observons

journellement en suivant l'évolution des abcès chauds. Le pus qui, primitivement, siège profondément, émigre vers la superficie, s'étale en nappe, produit des décollements parfois étendus et finit par ulcérer la peau. En somme il réalise la digestion protéique complète des tissus du voisinage.

Le pus peut se digérer lui-même, et c'est là le cas de la phase résolutive des collections qui n'ont pas abouti à l'ouverture, Les transformations digestives de l'albumine des leucocytes traversent les mêmes étapes d'évolution que les albumines ordinaires. Ils passent successivement à l'état d'albumoses, à l'état de peptones et d'acides aminés et finalement sont absorbés ou éliminés.

La protéase des leucocytes possède également le pouvoir digestif vis-à-vis de la fibrine. Au cours de la pneumonie Noël Fiessinger et Paul Baufle démontrent qu'au moment de la résolution le ferment protéolytique apparaît dans l'expectoration. Le ferment est le seul agent qu'on puisse incriminer dans le travail de liquéfaction de l'exsudat fibrineux qui remplit les alvéoles pulmonaires à la période de l'hépatisation. Plusieurs faits le prouvent ; nous signalons en premier lieu l'apparition des ferments dans l'expectoration, l'élimination des produits d'hydratation des albumines par les crachats et les urines, la leucocytose qui permet la production abondante des ferments et enfin la leucolyse intervient pour mettre le ferment en liberté.

Examinons maintenant les crachats d'un pneumonique. Au moment de la défervescence, nous y constatons

des modifications importantes Nous avons insisté précédemment sur l'apparition des ferments protéolytiques dans l'expectoration, signalons en même temps une diminution de l'albumine et une apparition des peptones qui s'explique par l'action de la protéase sur l'albumine et la fibrine de la sécrétion alvéolaire. Les modifications constatées dans l'urine traduisent le même processus. L'analyse chimique révèle : 1° l'apparition d'acide urique en quantité notable — indice de la destruction massive des nucléoprotéïdes, 2° l'apparition des peptones témoins de la digestion peptique massive des albuminoïdes, 3° dans les cas exceptionnels enfin, l'apparition d'un ferment qui liquéfie la gélatine. Tous ces phénomènes observés avec tant de précision par les auteurs que nous venons de nommer, indiquent que la masse de la fibrine épanchée dans les alvéoles est digérée complètement par le ferment protéolytique qui vient affluer avec les leucocytes dans les foyers d'infection. Depuis ces constatations, Ménetrier est venu apporter une preuve histologique à l'appui de ces faits. Ce savant a vu les leucocytes arrivés au milieu de l'exsudat fibrineux y creuser des logettes profondes. Donc, aujourd'hui, nous pouvons considérer ce processus comme absolument certain.

Mais l'action du ferment protéolytique en pathologie ne se borne pas là, il intervient également dans d'autres processus de défense organique. Son rôle dans la résorption des hématomes pleuraux et traumatiques est non moins évident. Guillain et Troisier s'arrêtent sur

la leucocytose secondaire qui accompagne les hématomes. Froin observe une poussée de polynucléose consécutive à une hémorragie méningée. On peut donc admettre que les leucocytes affluent au foyer où siège l'hématome, ils liquéfient le sang épanché et finalement le digèrent.

Enfin, la protéase leucocytaire peut être incriminée dans la production de certaines réactions générales importantes. C'est ainsi qu'on peut attribuer à l'action du ferment leucocytaire les manifestations fébriles transitoires, au cours de résorptions sanguines abondantes, de la leucémie aiguë, des différentes affections toxi-infectieuses, et enfin sous l'influence exercée par les rayons X. Tous ces processus accompagnés d'une leucolyse considérable libèrent brusquement une grande quantité de ferment qui exerce son action sur les centres thermiques. Les zymases sont produites en telle abondance qu'elles ne peuvent être neutralisées par l'action de l'antiferment insuffisant, et alors, une poussée fébrile se produit.

VIII. **Application thérapeutique**. — Les propriétés du ferment protéolytique, et son rôle dans l'organisme, ont inspiré à divers auteurs l'idée de les employer en thérapeutique en favorisant leur émission par les leucocytes. C'est ce principe qui a servi de base au Professeur Albert Robin pour établir sa méthode de traitement par les ferments métalliques, nous en avons parlé longuement dans le chapitre des oxydases.

Noël Fiessinger en collaboration avec les Docteurs A. Coyon et J. Laurence ont expérimenté ces diverses méthodes thérapeutiques et ont apporté une appréciation nouvelle de l'action curative du ferment. Ils ont étudié les processus locaux produits par cette médication intéressante.

Dans les processus locaux cette thérapeutique peut intervenir pour activer ou pour modérer la production du ferment protéolytique.

Dans les abcès froids qui sont caractérisés par l'absence de la protéase, l'introduction du ferment peut favoriser la digestion du pus et des parois de l'abcès et faciliter en même temps la guérison. Cette méthode peut être appliquée de deux manières. La première consiste à introduire dans la cavité de l'abcès une certaine quantité de papaïne selon la technique de A. Coyon Fiessinger et J. Laurence, ou de la trypsine préconisée par Jochmann et Baetzner. Ces deux méthodes exposent à l'infection secondaire ; aussi, un autre procédé doit leur être préféré, parce qu'il exerce la même action et n'expose pas aux dangers d'infection. Cette seconde méthode constitue dans la pratique des injections modificatrices telles que : éther iodoformé, huile créosotée et iodoformée, huile goménolée et naphtol camphré. Les injections modificatrices produisent une congestion intense de la paroi, avec afflux abondant des polynucléaires qui agissent ensuite, en liquéfiant les albumines de l'abcès tuberculeux.

Goldenberg propose d'employer dans le même but

le nucléinate de soude à 1 o/o en injection de 1 à 2 centimètres cubes à l'intérieur de l'abcès et en faisant suivre l'injection d'une irradiation aux rayons X.

Noël Fiessinger et J. Laurence considèrent l'irradiation comme inutile, car la destruction leucocytaire se produit spontanément sous l'influence de l'injection de nucléinate.

Cette méthode thérapeutique peut-être employée non seulement pour obtenir la guérison des abcès froids tuberculeux, mais également dans les épanchements pleuraux tuberculeux à évolution lente et apyrétique.

Par contre dans les suppurations aigues à polynucléaires la protéolyse peut évoluer avec une intensité trop grande, et dans un but thérapeutique, il est utile de recourir à l'antiferment du sérum humain pour modérer l'activité du ferment. Kolaczek prouve expérimentalement cette particularité de l'action du ferment et Müller et Peiser, pour la première fois, introduisent dans la pratique, la méthode de neutralisation de la protéase.

J. Laurence, dans sa thèse, publie des résultats très satisfaisants obtenus à l'aide de cette méthode, mais il insiste sur la nécessité absolue de lui associer le traitement chirurgical, car un large drainage de grandes collections chaudes est avant tout nécessaire. L'antiferment exerce seulement une action sédative et calmante ; sous l'influence de cette thérapeutique les phénomènes douloureux sont calmés en quelques instants.

CONCLUSIONS

Les travaux de ces dernières années ont permis d'approfondir les phénomènes vitaux et complexes produits par les ferments. Les globules blancs appartenant à la série myéloïde sont particulièrement riches en ces ferments. Les oxydases et les protéases sont des plus importantes.

I. Les oxydases leucocytaires peuvent être classées en deux catégories : 1° Les oxydases directes capables de produire l'acte d'oxydation à l'aide de l'oxygène de l'air et 2° les oxydases indirectes qui oxydent aux dépens de l'oxygène naissant provenant de la décomposition d'eau oxygénée.

Les oxydases directes sont recherchées à l'aide du réactif de Röhmann et Spitzer et se trouvent dans les granulations des myélocytes et des polynucléaires. On les retrouve également dans certaines cellules glandulaires.

La présence des oxydases indirectes est démontrée par la technique microchimique que nous avons décrite avec Fiessinger, grâce à l'emploi de la benzidine en solution alcoolique et de l'eau oxygénée. Les oxydases indirectes sont caractéristiques pour les éléments de la série myéloïde. Marfan, Ménard et Saint-Girons se basent sur ce caractère de l'oxydase indirecte ou péroxydase, pour employer sa recherche au lit du malade, comme moyen de diagnostic rapide de la nature cytologique des liquides épanchés. C'est le peroxydo-diagnostic effectué à l'aide de la solution aqueuse de gaïacol.

Les deux variétés d'oxydases sont localisées uniquement au niveau des granulations leucocytaires qui se comportent comme de véritables pivots d'oxydation.

En physiologie et en pathologie, les oxydases jouent un rôle capital. Les processus les plus importants sont fortement influencés par les processus oxydasiques. Le professeur Albert Robin a longuement insisté sur l'influence exercée par les oxydases sur les transformations oxydo-réductrices qu'elles produisent dans l'organisme, et sur leur action antitoxique et anti-infectieuse.

II. La protéase leucocytaire étudiée en Allemagne par Muller et Jochmann, et en France, par Noel Fiessinger et Pierre-Louis Marie, est un ferment caractéristique pour les éléments de la série myéloïde.

Comme la trypsine pancréatique, la protéase produit dans l'organisme l'acte d'hydratation de la molécule albuminoïde et la transforme successivement en toute

une série de polypeptides dont le produit aboutissant ont les acides aminés.

Expérimentalement, l'existence de la protéase peut être démontrée par la production de petites cupules arrondies sur une surface lisse de l'ovalbumine coagulée, où on dépose préalablement de fines gouttelettes d'émulsion leucocytaire.

Pour la recherche de la protéase nous avons utilisé également la technique de dialyse et la méthode chimique, qui nous ont donné l'une comme l'autre des résultats intéressants au sujet de l'intensité des processus fermentatifs et de la sensibilité du ferment à la chaleur.

L'existence du ferment protéolytique ne dépend pas de la présence de granulations protoplasmiques, car on le retrouve également dans des myélocytes non granuleux.

Les ferments de défense d'Abderhalden et la protéase leucocytaire sont deux ferments absolument distincts. Les premiers sont des ferments spécifiques ; ils sont thermolabiles mais leur réactivation par un complément est possible. Par contre, la protéase est non spécifique, son action est favorisée par l'autolyse, elle est également thermolabile à une température plus élevée, mais la réactivation n'exerce qu'une influence minime.

Le rôle de la protéase est non moins étendu que celui des oxydases. En physiologie le ferment protéolytique intervient dans les processus de la digestion, dans le fonctionnement glandulaire et dans la désintégration musculaire.

En pathologie, le ferment protéolytique intervient dans la résorption de l'exsudat fibrineux de la pneumonie et dans les résorptions hématiques.

Vu :
Le Président de Thèse,
Albert ROBIN.

Vu :
Le Doyen,
LANDOUZY.

Vu et permis d'imprimer
Le Vice-Recteur de l'Académie de Paris.
LIARD.

BIBLIOGRAPHIE

Abelous J.-E. et J. Aloy. — Sur quelques conditions de l'activité d'un ferment oxydant. *C. R. de la Soc. de Biologie*, séance du 5 juillet 1903. t. 55, p. 891.

Abelous J.-E. et G. Biarnès. — Nouvelles expériences sur le mécanisme des oxydations organiques. *C. R. de la Soc. de Biologie*, séance du 25 janvier 1896. t. 48, p. 95.

— Hiérarchie des organes au point de vue du pouvoir oxydant. *C. R. de la Soc. de Biologie*, séance du 7 mai 1896. t. 48, p. 262.

— Sur les ferments solubles oxydants de l'organisme. *Congrès international de Moscou* 1897. Section III, t. 2., p. 2.

— Sur l'existence chez les mammifères d'une oxydase globuline. Ses caractères et ses propriétés. *Arch. de physiologie normale et pathologique* 1898. S. 5. t. 10, p. 664-671.

Achalme. — Recherches sur la présence des ferments solubles dans le pus. *C. R. de la Soc. de Biologie*. 1er juillet 1899. S. 11. t. I, p. 568.

Achard, Ramond et Foix. — Sur l'activité des cellules éosinophiles. *C. R. de la Soc. de Biologie*, 24 avril 1907.

Berestnew M. N. — Des propriétés fermentatives du sang et du pus. *Archives des sciences biologiques de St-Pétersbourg*. t. III, 1895, p. 40.

Bith Henry. — L'amino-acidurie. Thèse de Paris 1913.

Bourquelot Émile. — Remarques sur les matières oxydantes que l'on peut rencontrer chez les êtres vivants. *C. R. de la Soc. de Biologie* 1897. t. XLIX, p. 402-406 et p. 498. *Journal de phys. et chimie*, 6e série 1897. t. V, p. 465.

Bourquelot Emile.— Sur le rôle des ferments oxydants et des substances oxydantes dans la pratique pharmaceutique. *Congrès international de Moscou* 1897. Série IV c. t. II, p. 16. *Journal de phys. et chimie*, 6e série, t. VI p. 426.

Carrière G. (de Lille). — Sur la présence d'oxydases indirectes dans les liquides normaux et pathologiques de l'homme. *C. R de la Soc. de Biologie*, 24 juin 1899, p. 561.

Carnot Paul. — Sur le ferment oxydant de la salive et de quelques autres sécrétions. *C. R. de la Soc. de Biologie*. Séance du 30 mai 1896, t. 48, p. 553.

Coyon A., Fiessinger N. et Laurence J. — Comment on guérit un abcès froid. *Journal des Praticiens*, 2 octobre 1909.

Danilewski (de Charkoff). — Contribution à l'étude des phagocytes. *Annales de l'Institut Pasteur* 1890, p. 432.

Dejust-Defiol (Madame). — Contribution à l'étude de la réaction d'Abderhalden. *Thèse de Paris*, 1914.

Delezenne et Pozerski. — Action protéolytique du sérum après son traitement par le chloroforme. *C. R. de la Soc. de Biologie*, 1903, t. LV, p. 327 et 690.

Duclaux. — Traité de microbiologie. T. II. Diastases, toxines et venins.

Dumm John S. — L'oxydase-réaction dans les tissus myéloïdes. *Journ. of. Pathol. and Bactériologie*, vol. XV.

Enriquez et Sicard. — Les oxydations de l'organisme. Actualités médicales, Paris 1902.

Eppenstein. — Ueber das proteolytische Ferment der Leukocyten, insbesondere bei der Leukämie, und die fermentheammende Wirkung des Blutserums. *Münch. Mediziniche Wochenschrift*, 1906 le 6 novembre, n° 45, p. 2192.

Erben F. — *Zeitchrift für Hteilkunde* 1903, Bd. 24, H II.

— Ueber das protéolytische Ferment der Leukozyten und die Antolyse normales Menschenblutes *Münch, Med. Wochenschrift*, t. LIII, 25 décembre 1906, p. 2567.

Etienne G. — Réaction leucocytaire par l'agent colloïdal dans la pneumonie, notamment chez les vieillards *Archives de Médecine expérimentale et d'anatomie pathologique*, n° 2, mars 1911, p. 151.

Etienne G. et M. Perrin. — La leucocytose et l'équilibre leucocytaire dans la pneumonie des vieillards. *Journal de Physiologie et de Pathologie générale*, 1909 janvier.

Fiessinger Noël. — L'antiferment protéolytique. *Archives des maladies du cœur et du sang*, août 1901.

Fiessinger Noël et Baufle Paul. — Contribution à l'étude de la crise pneumonique. Du rôle des ferments leucocytaires dans la résolution de l'exsudat pneumonique. *Revue de Médecine* 10 avril 1910 n° 4, page 273.

Fiessinger Noël et Jean Broussolle. — Existence d'un ferment de défense d'Abderhalden dans le sérum d'un ictère grave. *Bulletins et Mémoires de la Soc. méd. des Hôpitaux*, 7 novembre 1913.

Fiessinger Noël et Pierre-Louis Marie. — A propos d'un cas de leucémie aiguë myélogène à forme hémorragique *Bull. et Mémoires de la Soc. méd. des Hôpitaux*, 15 janvier 1909, *Tribune Médicale* 16 janvier 1909.

Fiessinger Noël et Pierre-Louis Marie. — Le ferment protéolytique des leucocytes dans les exsudats des séreuses. Le zymo-diagnostic. *Soc. Méd. des Hôpitaux*, 28 mai 1009.

— Le ferment protéolytique des leucocytes dans les exsudats. *C. R. de la Soc. de Biologie*, 28 mai 1909.

— Le ferment protéolytique des leucocytes dans les méningites aigues à pneumocoques. *C. R. de la Soc. de Biologie*, 5 juin 1909.

— Le ferment protéolytique des leucocytes. Technique. Application à la pathologie générale. *Journal de Physiologie et de Pathologie générale*, juillet 1909, 1er mémoire.

— Le ferment protéolytique des leucocytes. Application à la pathologie générale. *Journal de Physiologie et de Pathologie générale*, 15 sept. 1909.

— Les ferments digestifs de leucocytes (protéase et lipase). Le zymo-diagnostic. Paris 1910, Maloine.

Fiessinger Noël et L. Roudowska. — La réaction oxydante des leucocytes. *C. R. de la Soc. de Biologie*, 23 décembre 1911, t. 71, p. 714.

— Réaction micro-chimique des leucocytes à la benzidine *C. R. de la Soc. de Biol.*, 6 juillet 1912.

— La réaction micro-chimique dans les tissus humains. *Archives de Médecine Expérimentale et d'Anatomie pathologique*, t. XXIV, n° 5, septembre 1912, p. 585.

— Etude des protéases leucocytaires à l'aide de la technique de dialyse. *C. R. de la Soc. de Biologie* 10 avril 1914, n° 13, t. LXXVI, p. 573.

Frank Erich und Félix Rosenthal (*de Breslau*). — Experimentelle Untersuchungen über die Spezifität der proteolytischen Schutzfermente (Abderhalden) *Münch med. Wochenschrift*, n° 26, 1913, 1re note.

Frank Erich, Félix Rosenthal und Hans Biberstein. — Experimentelle Untersuchungen über die Spezifität der protéolytichen Abwehr (Schutz) fermente (Abderhalden). — *Münch. med. Wochenschrift*, n° 29, 1913, 2e note.

Von Gierke Edgard. — Die Oxydierenden Zellfermente *Münch. mediz. Wochenschrift*, 31 octobre 1911, p. 2315, n° 44.

Goldenberg. — Ueber die Ferment behandlung tuberkuloeser Abzesse. *Münch. med. Wochenschrift*, 5 janvier 1909.

Guillain G. et Troisier J. — Physiologie pathologique de l'hematome pleural traumatique. *Semaine méd.* 24 mars 1909.

Jochmann G. — Zur Bedeutung des proteolytischen Leukozyten ferments für die pathologische Physiologie, *Virchows Archiv*. Bd. 194, H. 2. p. 342.

Jochmann et Baetzer. — *Münch med. Wochenschrift*. Dezember 1908, nº 49.

Jochmann G. et Muller E. — Weitere Ergebnisse unserer. Methode zum Nachweis proteolytischer Ferment. Wirkungen. *Munch. med. Wochenschrift*, nº 41, 9 octobre 1906, p. 2.002.

Laurence J. — Quelques applications cliniques et thérapeutiques des notions récentes sur la protéase leucocytaire dans les suppurations. Thèse de Paris 1909.

Léry André. — La séro-réaction à la fibrine (suivant le procédé dialytique d'Abderhalden) dans le diagnostic des hémorragies de l'hémorragie cérébrale en particulier. *Bulletins et mémoires de la Soc. médicale des Hôpitaux*. Séance du 22 mai 1914, p. 949.

Manoukhine J. J. — Sur la « leucocyto-thérapie » au cours de la pneumonie. *Roussky Wratch* 1910, nº 26, p. 897.

Manoukhine JJ., Noël Fiessinger et G.-A. Krolunitsky.

— Action des ferments métalliques sur les variations quantitatives des globules blancs et sur les leucocytolysines du sang. *Revue de médecine*, 10 juillet 1912, n° 7, p. 505.

Marfan, P.-J. Menard et Saint-Girons. — Utilité de la recherche d'une péroxydase dans les liquides pathologiques. Essais de péroxydo-diagnostic. *Bulletins et Mémoires de la Soc. méd. des Hôpitaux*, t. 34, troisième série, 1912, séance du 26 juillet, p. 235.

Mbrie Pierre-Louis. — De l'antipepsine. Recherches expérimentales sur la résistance des tissus vivants à la digestion peptique. Thèse de Paris, 1913.

Muller Eduard und Jochmann Georg. — Ueber eine einfache Methode zum Nachewis proteolytiche Fermentwirkungen (nebsteinigen Ergebnisse, besonders bei der Leukaemie). *Munch. med. Wochenschrift*, n° 29, 1906 17 juillet, p. 1394.

— Ueber proteolytiche Fermentwirkungen der Leukozyten. *Munch. med. Wochenschrift*, n° 31, 31 juillet 1906, p. 1507.

Muller und Kolaczek. — Weitere Beiträge zur Kentnis des proteolytischen Leukozytenferments und seines Antiferments. *Munch. med. Wochenschrift*, n° 8, 18 février 1907, p. 355.

Nattan-Larrier et Parvu. — Recherches sur le pouvoir phagocytaire des polynucléaires l'éosinophiles. *C. R. de la Soc. de Biologie*. Séance du 3 avril 1909.

Opie E. — Enzyme and antienzyme of inflammatory Exsudates. *Journ. of exper. Medicine* t. VII 1905.

Opie E. et Bertha Barker. — Enzymes of tuberculous tissue. — *Journ. of exper. Medicine*, t. X, p. 645.

Portier Paul. — Les oxydases dans la série animale, leur rôle physiologique. Thèse de Paris 1897.

— L'oxydase du sang des mammifères est-elle une véritable oxydase? *C. R. de la Soc. de Biologie* le 23 avril 1898, p. 453.

Robin Albert. — Action thérapeutique des ferments métalliques. *Bulletins et mémoires de la Soc. de Thérapeutique*, 1904, 4e série, t. IX, p. 513.

— Note sur les ferments métalliques; leur action sur le métabolisme, leurs effets dans la pneumonie. *Bulletin général de thérapeutique*, 13 décembre 1904, t. CXLVIII, p. 854.

— Ferments métalliques. 1907, Paris, Rueff, édit.

Robin Albert et G. Bardet. — Action des métaux à l'état colloïdal et des oxydases artificielles sur l'évolution des maladies infectieuses. *C. R. hebdomadaires des séances de l'Académie de médecine*, 21 mars 1904, t. CXXXVIII, p. 783.

— Les ferments métalliques en thérapeutique. Considérations biologiques. *Revue scientifique*, 11 février 1905, n° 6, 5e série, t. III, p. 161.

Robin Albert et Noël Fiessinger. — Péricardite gonococcique à épanchement. Ponction au point de Marfan. Traitement par les ferments métalliques (argent électrique) et les vaccins de Wright. Gué-

rison. *Bulletins et mémoires de la Soc. méd. des Hôp.*, séance du 20 déc. 1912, t. 34, série III, p. 802.

Robin Albert, Noël Fiessinger et Jean Broussolle. — Le ferment de défense contre le foie dans les maladies hépatiques. *Bull. et Mémoires de la soc. méd. des Hopitaux*, Séance du 23 juillet 1914.

Robin Albert et Paul Emile Weil. — Action des ferments métalliques sur les éléments figurés du sang. *Bull. général de thérapeutique* t. CL, 1905 p. 252 et *Bulletin de l'Académie de Médecine*, 18 juillet 1905, p. 105.

— Action des ferments métalliques sur la production de l'azote total de l'urée, de l'acide urique, etc. Acide urique et leucolyse. *Bulletin de l'Académie de médecine* juillet 1905 et *Bulletin général de thérapeutique*, t. CL, 23 août 1905, p. 256 ; *Presse médicale* n° 13, 1905.

Sée Pierre. — Contribution à l'étude des applications thérapeutiques des oxydases et des métaux-ferments. Thèse de Paris, 1905.

— Les oxydases. Leur rôle physiologique et leur application thérapeutique. *Archives générales de Médecine*, 1906, 2e semestre, vol. 197, p. 1812.

Sieber N. (Mme). — De la destruction des toxines au moyen des peroxydases et des oxydases d'origine animale et végétale. *Archives des sciences biologiques*. Saint-Pétersbourg, 1903, t. IX, p. 169.

Slovtsoff B. J. — Contribution à l'étude des oxydases de l'organisme. Thèse de Saint-Pétersbourg 1899.

Spanjer-Herford Richard. — Vergleichende Untersuchungen mit Indophenol Oxydasereaction an Speichel und Tränendrüssen der Säugetiere. *Virchows Archiv*, 1911, Bd. 205, H. 2, p. 276.

Steisig Zdzislaw (de Lemberg). — Ueberg die Natur des bei der Abderhaldenschen Reaktion wirksamen Ferments. *Münch. med. Wochenschrift*. t. LX n° 28, 15 juillet 1913, p. 1513.

Schultze W.-H. — Die Oxydaseréaktion an Geweb schnitten. und ihre Bedeutung fur die Pathologie. Zugleich an Beitrag zur Differentialdiagnose der Leukâmien. *Beitrâge zur pathologischen anatomie und algemeinen Pathologie von Ziegler* 1909, t. 45. Erstes Heft, p. 127-153.

— Ueber die Oxydaseréaktion der Speichelund Trânendrusen. *Verhandlungen der Dentchen Pathologichen Gosetlschaft*. 1909, t. 13, p. 235-241.

Winkler Ferdinand. — Die Oxydasereaktion im gonorrhoischen Eiter. — *Folia hematologica*, Bd. V, 1908, p, 17.

— Der Nachweis von Oxydasen in den Leukozyten miltels der Dimethylparaphenylendiamin, α naphtol réaction. *Folia hématologica*, 1907, t. 4, p. 323.

— Die Fârbung der Leukozyten granula mit Sudan und Alpha-naphtol. *Folia hématologica*. August, 1912, Bd. XIV. Heft 1, p. 23.

TABLE DES MATIÈRES

PAGES

Avant-Propos 13

Introduction 15

Phagocytose 15

Action des anticorps 17

Ferments leucocytaires 19

Ferments du sérum 21

Ferments en général et leur action 22

ÉTUDES DES OXYDASES DIRECTES ET INDIRECTES

I. — Étude générale 27

II. — Propriétés chimiques des oxydases 29

III. — Etude microchimique 35

1° *Les ferments oxydants directes* 35

Etude générale 35

Technique 38

Aspect de la réaction 41

Variations pathologiques 44

2° *Les oxydases indirectes* 49

Technique 49

Aspect de la réaction 51

IV. — Application diagnostique 53

V. — Rôle des oxydases en physiologie pathologique 57

VI. — Rôle des oxydases en thérapeutique 65

ÉTUDE DE LA PROTÉASE

I. — Étude générale 77
II. — Propriétés de la protéase 82
III. — Technique 86
IV. — Technique de la dialyse appliquée a l'étude des protéases leucocytaires 90
1° Technique 90
2° Résumé des expériences 94
3° Conclusions 100
V. — Recherche des acides aminés dans le pus par la technique chimique 104
Technique 104
Conclusions 107
VI. — Application diagnostique 107
VII. — Role physiologique de la protéase et son application pathologique 110
VIII. — Application thérapeutique 115

Conclusions 119
Bibliographie 123

Imprimerie spéciale de la Librairie Ollier-Henry
26, Rue Monsieur-Leprince. — Paris.